



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL QUIMIOPROTETOR DE
NANODISPERSÃO E EXTRATO ETANÓLICO DE *Mikania glomerata*
Sprengel (ASTERACEAE).**

ESDRAS ANDRADE SANTANA

VITÓRIA

2016



Esdras Andrade Santana

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL QUIMIOPROTETOR DE
NANODISPERSÃO E EXTRATO ETANÓLICO DE *Mikania glomerata*
Sprengel (ASTERACEAE).**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Maria do Carmo Pimentel Batitucci

VITÓRIA

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

- S231a Santana, Esdras Andrade, 1987 -
Avaliação do potencial quimioprotetor de
nanodispersão e extrato etanólico de Mikania glomerata
Sprengel (asteraceae) / Esdras Andrade Santana –
2016.
61 f. : il.
- Orientador: Maria do Carmo Pimentel Batitucci.
- Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)
– Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de
Ciências da Saúde.
1. Asteraceae. 2. Mutagênicos. 3. Preparações
Farmacêuticas. I. Batitucci, Maria do Carmo Pimentel. II.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de
Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 615

Esdras Andrade Santana

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL QUIMIOPROTETOR DE
NANODISPERSÃO E EXTRATO ETANÓLICO DE *Mikania
glomerata* Sprengel (ASTERACEAE).**

Trabalho de Dissertação de Mestrado aprovado em 04/02/2016 para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Espírito Santo

BANCA EXAMINADORA:


Prof. Drª. Silvia Tamie Matsumoto / UFES


Prof. Drª. Cristiane dos Santos Giuberti / UFES


Profª. Drª. Maria do Carmo Pimentel Batitucci (orientadora) / UFES

Vitória

2016

À minha esposa **Eliana** e ao meu filho **Benjamin**, minhas principais razões de prosseguir persistentemente.

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre ao meu lado, me direcionando aos melhores caminhos e por sempre me lembrar de que não preciso lutar sozinho.

À minha querida esposa Eliana, por todo o amor, apoio e incentivo. Por me fazer acreditar que posso ir mais longe que imagino, por sempre estar ao meu lado mesmo em momentos difíceis e por ser tão importante na minha vida.

Ao meu amado filho Benjamin, por ser um presente que ganhei durante esta jornada, me fazendo ser uma pessoa melhor, mais dedicada e por me fazer esquecer dos problemas todos os dias com um simples sorriso.

Aos meus pais, Avenilton e Eunice, por apoiarem minhas decisões e por me ensinarem a sempre fazer o meu melhor em tudo.

Aos meus irmãos, Mondigliane e Murilo, por todo apoio, carinho e torcida.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Maria do Carmo Pimentel Batitucci, por acreditar e confiar em mim, mesmo antes de me conhecer, por toda a dedicação, disponibilidade, auxílio e amizade, meu muito obrigado.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Hildegardo Seibert França, por todo o apoio e dedicação e comprometimento ao projeto.

Ao Prof. Dr. Caio Pinho Fernandes, por toda a colaboração e pelo desenvolvimento das nanoformulações.

Ao colega e amigo Jean Vencioneck, por todo o auxílio e treinamento nos tratamentos realizados e por toda a disponibilidade e colaboração no projeto.

Aos colegas do Laboratório de Genética Vegetal e Toxicológica, pela amizade e ajuda e oportunidade da convivência.

Ao Instituto Capixaba de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural (INCAPER), pelo fornecimento do material vegetal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo suporte financeiro concedido durante a realização deste trabalho.

"Tudo posso naquele que me fortalece"
(Filipenses 4:13)

RESUMO

Mikania glomerata Sprengel é uma planta medicinal que possui a cumarina como marcador químico e devido às propriedades broncodilatadoras é extensamente utilizada na medicina tradicional brasileira. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial do extrato etanólico (EE) e nanodispersão (ND) de *M. glomerata* contra os efeitos citotóxicos e mutagênicos induzidos pelo quimioterápico ciclofosfamida (CPA). Esta avaliação foi realizada por meio do ensaio do micronúcleo em eritrócitos de medula óssea de camundongos albinos *Swiss (Mus musculus)* *in vivo* utilizando o protocolo de tratamento simultâneo. Os tratamentos com EE foram realizados nas concentrações 1,0; 0,5; 0,25; 0,008 e 0,004 mg.kg⁻¹ de cumarina e com a ND nas concentrações 0,008 e 0,004 mg.kg⁻¹ de cumarina. Os resultados obtidos demonstraram que a maioria dos tratamentos reduziu os danos citotóxicos promovidos pela CPA. Apenas o tratamento com EE na concentração 0,004mg.kg⁻¹ de cumarina não apresentou este efeito. Na avaliação da antimutagenicidade, os tratamentos com EE (1,0; 0,5 e 0,25 mg.kg⁻¹ de cumarina) e com a ND (0,008 e 0,004 mg.kg⁻¹ de cumarina) demonstraram-se eficazes na redução da frequência de micronúcleos, apresentando-se como agentes antimutagênicos. Esses resultados também sinalizaram que o tratamento com a ND (0,008 mg.kg⁻¹ de cumarina) apresentou maior efetividade, alcançando 60,38% de redução de danos mutagênicos. De modo geral, os componentes ativos de *M. glomerata* administrados através das nanodispersões foram mais eficientes na ação quimioprotetora, mesmo contendo concentrações muito inferiores do marcador químico, nas condições experimentais. Estes resultados reforçam a relevância da utilização da nanotecnologia para veiculação de compostos naturais e o potencial da tecnologia de extração de compostos através de nanodispersões.

Palavras chave: *Mikania glomerata*, nanodispersão, antimutagenicidade, ensaio do micronúcleo.

ABSTRACT

Mikania glomerata is a medicinal plant having the coumarin as a chemical tracer, and due to bronchodilatory properties is widely used in traditional medicine in Brazil. The main objective of this study was to evaluate the potential of ethanol extract (EE) and nanodispersion (ND) of *M. glomerata* against cytotoxic and mutagenic effects induced by chemotherapy cyclophosphamide (CPA). This assessment was performed using micronucleus assay in bone marrow erythrocytes of Swiss albino mice (*Mus musculus*) *in vivo* through the simultaneous treatment protocol. The treatments using EE were performed with the 1.0; 0.5; 0.25; 0.008 e 0.004 mg.kg⁻¹ concentrations of coumarin and ND in 0.008 e 0.004 mg.kg⁻¹ concentrations of coumarin. The results showed that most of treatments reduced the cytotoxic damage caused by CPA. Only the treatment with EE 0.004 mg.kg⁻¹ of coumarin did not show this effect. In the evaluation of antimutagenicity, the treatments with 1.0; 0.5; 0.25 mg.kg⁻¹ concentrations of coumarin and ND (0.008 e 0.004 mg.kg⁻¹ of coumarin), demonstrated to be effective in reducing the micronucleus frequency, which means they are antimutagenic agents. The treatment using ND (0.008 mg.kg⁻¹ of coumarin) showed a 60.38% damage reduction, indicating greater effectiveness among the treated groups. Overall, treatments with nanodispersions were more efficient in chemoprotective action, although its low coumarin content in the experimental conditions. The results reinforce the importance of using nanotechnology to transport of natural compounds and the potential of compounds extraction technology through nanodispersions.

Keywords: *Mikania glomerata*, nanodispersion, antimutagenicity, Micronucleus assay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Mikania glomerata</i> (guaco).....	17
Figura 2: Estrutura química da cumarina	18
Figura 3: Ilustração esquemática de nanopartícula composta de tensoativos	20
Figura 4: Formação de células micronucleadas.	25
Figura 5: Representação esquemática do processo de maturação dos eritrócitos na medula óssea.	26
Figura 6: Fotomicrografia do eritrócito policromático micronucleado (MNPCE), eritrócito policromático (PCE) e eritrócito normocromático (NCE). (Aumento de 1000X)	26
Figura 7: Aspecto das nanodispersões à base de guaco.....	38
Figura 8: Espectro obtido por espectrofotometria após análise da nanodispersão (A) e espectro obtido após análise do branco da formulação (B)..	40
Figura 9: Cromatograma da nanodispersão de <i>M. glomerata</i> com a respectiva fragmentação comparando com a biblioteca NIST.....	41
Figura 10: Cromatograma do padrão de cumarina com a respectiva fragmentação comparando com a biblioteca NIST	42
Figura 11: Representação da curva de calibração obtida por CLAE-UV/VIS para o padrão de cumarina.....	44
Figura 12: Cromatograma obtido por CLAE-UV/VIS da solução padrão de cumarina (A), extrato etanólico bruto (EEB) (B) e nanodispersão (ND) (C).	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proporção relativa dos constituintes das diferentes dispersões aquosas de tensoativos empregadas na preparação das nanodispersões de <i>Mikania glomerata</i>	30
Tabela 2: Caracterização das nanodispersões à base de <i>Mikania glomerata</i>	39
Tabela 3: Concentrações de cumarina e suas respectivas áreas sob a curva.	44
Tabela 4: Frequência de MNPCE e relação de PCE/(PCE+NCE), em 1000 células (média \pm DP), seguindo o protocolo de Tratamento Simultâneo com extrato etanólico e nanodispersão de <i>Mikania glomerata</i>	47

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de variância (do inglês analysis of variance)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CD	Cluster de diferenciação
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CG/EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrômetro de massa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
CPA	Ciclofosfamida
CYP	Citocromo P450 (do inglês cytochrome P450)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês Deoxyribonucleic acid)
DP	Desvio padrão
DP400	Dioleato de polietilenoglicol 400
EEB	Extrato etanólico bruto
EHL	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico
INCAPER	Instituto Capixaba de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural
m.c	Massa corpórea
MeOH	Metanol
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MNPCE	Eritrócito policromático micronucleado (do inglês micronucleated polychromatic erythrocytes)
MP400	Monooleato de polietilenoglicol 400
NCE	Eritrócito normocromático (do inglês normochromatic erythrocytes)
ND	Nanodispersão
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCE	Eritrócito policromático (do inglês polychromatic erythrocytes)
pH	Potencial hidrogeniônico
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
qsp	Quantidade suficiente para

r	Coeficiente de correlação
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês ribonucleic acid)
rpm	Rotações por minuto
SUS	Sistema Único de Saúde
v.i	Via intraperitoneal
v/v	volume/volume
vo.	Via oral
λ_{max}	Comprimento de onda máximo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Plantas medicinais	15
2.2 <i>Mikania glomerata</i> Sprengel	17
2.3 Nanoformulações	19
2.4 Mutagenicidade	22
2.5 Antimutagenicidade	23
2.6 Teste do micronúcleo	24
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Material botânico	29
4.2 Obtenção das nanodispersões (ND)	29
4.2.1 Caracterização de nanopartículas	30
4.2.2 Análise espectrofotométrica	31
4.2.3 Cromatografia em fase gasosa	31
4.3 Preparo do extrato etanólico (EE)	32
4.4 Doseamento de cumarina.....	32
4.5 Ensaio do micronúcleo em medula óssea de camundongos	33
4.5.1 Agente indutor de danos ao DNA.....	33
4.5.2 Extrato etanólico e nanodispersão	33
4.5.3 Animais.....	34
4.5.4 Delineamento dos experimentos de antimutagenicidade	34
4.5.5 Tratamento simultâneo.....	35
4.6 Preparação citológica e análise	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Nanodispersões	38
5.1.1 Caracterização de nanopartículas.....	38
5.1.2 Análise espectrofotométrica	40

5.1.3 Cromatografia em fase gasosa	41
5.2 Quantificação de cumarina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	43
5.3 Ensaio do micronúcleo em medula óssea de camundongos	46
5.3.1 Avaliação da Citotoxicidade	46
5.3.2 Avaliação da Antimutagenicidade	47
6 CONCLUSÕES	52
7 REFERÊNCIAS.....	53
ANEXO A	61

1 INTRODUÇÃO

Plantas medicinais são utilizadas desde a antiguidade, em várias partes do mundo, para a prevenção e tratamento de enfermidades. Atualmente as plantas despertam grande interesse no desenvolvimento de novas drogas, uma vez que, devido a sua vasta capacidade biossintética, fornecem uma grande quantidade de agentes terapêuticos (ARAÚJO et al., 2014; ATANASOV et al., 2015).

As plantas medicinais produzem compostos que possuem diversas atividades biológicas. Estes compostos também podem ser capazes de prevenir ou corrigir danos mutagênicos e devido a isso têm recebido uma atenção especial. Além disso, estudos recentes sugerem que o procedimento mais eficaz para a prevenção do câncer e de doenças genéticas se dá pela utilização contínua de substâncias antimutagênicas, dentre elas, as substâncias de origem vegetal (FERGUSON, 1994; SŁOCZYŃSKA et al., 2014).

Outra abordagem possível na investigação de substâncias com atividade antimutagênica é a utilização de formulações mais eficazes para veiculação de compostos conhecidamente antimutagênicos com o objetivo de potencializar seus possíveis efeitos. Nesta perspectiva se destacam as nanoformulações, principalmente por contribuírem para o aperfeiçoamento de diversas propriedades farmacológicas, produzindo uma série de vantagens, como maior estabilidade, características organolépticas favoráveis, maior poder de penetração por membranas, maior biodisponibilidade, incremento da solubilidade para substâncias pouco solúveis, liberação controlada de substâncias e até mesmo a capacidade de evitar o efeito de primeira passagem sofrido por algumas substâncias no fígado (IRACHE et al., 2011; YAO; XIAO; MCCLEMENTS, 2014).

Neste contexto, o presente trabalho tem como finalidade avaliar a atividade antimutagênica do extrato etanólico de *Mikania glomerata*, uma importante espécie vegetal nativa da flora brasileira, por meio do ensaio do micronúcleo *in vivo*, em medula óssea de camundongos (*Mus musculus*) e comparar as atividades antimutagênicas entre o extrato etanólico e uma nanodispersão contendo cumarinas extraídas de *Mikania glomerata*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plantas medicinais

A humanidade desenvolveu, de forma empírica, através dos milênios de sua existência, o conhecimento sobre plantas com propriedades medicinais, que são utilizadas para prevenção, tratamento e cura de enfermidades, e por muito tempo esta foi a única forma de tratamento existente. Este conhecimento foi transmitido através das gerações e até hoje a medicina tradicional utiliza plantas para fins terapêuticos, seja por dificuldade de acesso a medicamentos industrializados ou mesmo por opção (BONIFÁCIO et al., 2013; RATES, 2001).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define como planta medicinal, “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos”. Além disso, afirma que 88% da população de países em desenvolvimento fazem uso de plantas medicinais nos cuidados básicos de saúde (ARAÚJO et al., 2014; VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005).

As plantas medicinais sempre estiveram presentes como opção terapêutica na medicina, no entanto, após a revolução industrial e o desenvolvimento da química orgânica houve um aumento da produção e utilização de moléculas sintéticas como medicamentos. Neste período, considerava-se que as plantas medicinais não possuíam efeito farmacológico algum e a utilização de produtos naturais era praticada em função de superstição religiosa e constituía uma opção terapêutica para pessoas de baixo nível de escolaridade e de baixo poder aquisitivo (RATES, 2001).

No entanto, com o passar dos anos, os medicamentos sintéticos apresentaram limitações, sendo relatados altos índices de efeitos colaterais, ineficácia terapêutica e dificuldade na obtenção de produtos mais eficazes. Em decorrência disso, o interesse por produtos naturais foi restabelecido, principalmente, como parte do desenvolvimento de novas drogas devido à vasta capacidade biossintética das plantas (ATANASOV et al., 2015; RASKIN et al., 2002).

O Reino vegetal possui um elevado número de espécies com uma diversidade enorme de diferentes compostos bioativos. Apesar disso, estima-se que apenas 6% das espécies vegetais existentes têm sido pesquisadas quanto às suas atividades farmacológicas, e apenas 15% quanto à composição fitoquímica. Embora a descoberta de novos fitoterápicos represente uma tarefa complexa, o cenário atual apresenta evoluções científicas, avanços tecnológicos e tendências que indicam claramente que os produtos naturais estarão entre as mais importantes fontes de novas drogas (ATANASOV et al., 2015).

Neste sentido, em 2006 o governo brasileiro instituiu medidas para incentivar a utilização de plantas medicinais em todos os níveis de atenção, com ênfase na atenção básica. Inicialmente, foi publicada a Portaria do Ministério da Saúde de nº 971 de 03 de maio de 2006, que aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS). E posteriormente, a “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos” que incentiva as pesquisas e fornece diretrizes para implantação de serviços em caráter nacional pelas Secretarias de Saúde dos Estados, Distrito Federal e dos Municípios (BRASIL, 2006).

O Brasil possui grande parte da biodiversidade mundial. Estima-se que cerca de 20% de todas as plantas e microrganismos sejam exclusivamente encontrados no Brasil. Contudo, mesmo com incentivo governamental e o cenário atual apontando para a importância e necessidade da utilização de plantas medicinais e de fitoterápicos, apenas uma pequena parcela de espécies da biodiversidade brasileira ainda é objeto de qualquer investigação científica (CALIXTO, 2005).

Assim, pode-se dizer que é de fundamental importância a iniciativa de investigar propriedades terapêuticas de espécies ainda não investigadas, bem como pesquisar novas atividades farmacológicas e novas formas de veicular compostos de espécies já conhecidas no meio científico.

2.2 *Mikania glomerata* Sprengel

Mikania glomerata Sprengel é uma espécie vegetal pertencente à Família *Asteraceae* e nativa da flora brasileira. Possui ampla distribuição em diversos estados do país, principalmente nas regiões sul e sudeste, conhecida popularmente como guaco (Figura 1). Esta espécie vegetal é uma trepadeira arbustiva sublenhosa, de grande porte, com folhas de forma quase deltoide, com coloração verde escura (COSTA et al., 2008).



Figura 1: *Mikania glomerata* (guaco). Fonte: (NAPIMOGA; YATSUDA, 2010)

As folhas do guaco são extensamente utilizadas na medicina tradicional brasileira para o tratamento de doenças do trato respiratório devido ao seu efeito broncodilatador, expectorante e supressor da tosse (DALLA NORA et al., 2010; SILVA et al., 2012).

O xarope de guaco, produzido a partir do extrato alcoólico fluido, foi oficializado na 1ª edição Farmacopéia Brasileira, publicada em 1929, e atualmente faz parte da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais do Ministério da Saúde Brasileiro, demonstrando a importância deste fitoterápico para o tratamento da população na atenção básica de saúde do país (BRASIL, 2015; SILVA, 1929).

Diversos estudos fitoquímicos têm sido realizados com esta espécie e dentre os diversos compostos encontrados estão a cumarina, ácidos, álcoois, ésteres diterpênicos, aldeídos e ésteres orgânicos, saponinas, taninos, esteroides e minerais (GASPARETTO et al., 2010). Apesar de possuir esta diversidade de compostos, a cumarina é a substância que tem sido relacionada à ação farmacológica observada quando da utilização do guaco, sendo também a substância encontrada em quantidade majoritária na planta (MOURÃO et al., 2014; NAPIMOGA; YATSUDA, 2010).

A cumarina (1,2-benzopirona) (Figura 2) é biossintetizada através da via do ácido chiquímico derivada do metabolismo da fenilalanina. Essa substância pertence à família das benzopironas, que é um metabólito comum encontrado no Reino vegetal (VIEIRA, 2010). As cumarinas são compostos altamente lipofílicos de grande interesse acadêmico e econômico por possuir diversas aplicabilidades. Muitas atividades biológicas também têm sido associadas às cumarinas como: atividade antifúngica, antimicrobiana, antialérgica, anti-inflamatória e antiofídica. Uma outra atividade importante desta molécula é a capacidade de interagir de forma eletrostática com a molécula de DNA, com esta característica a cumarina pode ser capaz de proteger o material genético contra danos causados por agentes mutagênicos que atuam danificando diretamente o DNA (COSTA et al., 2008; MOURÃO et al., 2014; SARWAR et al., 2015).

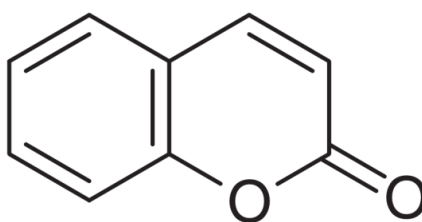


Figura 2: Estrutura química da cumarina. Fonte: (KATSORI; HADJIPAVLOU-LITINA, 2014)

Gasparetto e Pontarolo (2010) afirmam que, no geral, o guaco não apresenta efeitos tóxicos significativos em seres humanos. No entanto, ainda existem divergências na literatura científica quanto à toxicidade dos extratos do guaco e da cumarina. Alguns estudos demonstram possíveis efeitos genotóxicos do guaco (COSTA et al., 2008; DALLA NORA et al., 2010). Contudo, Costa et al. (2008) sugerem ser provável que

esses efeitos não sejam provenientes da cumarina e sim de outras substâncias presentes na planta, já que a concentração de cumarina não interferiu nos danos observados em testes do micronúcleo e do cometa. Em contrapartida, outro estudo observou que o extrato de plantas do gênero *Mikania* produzem efeito protetor e reparador de danos ao DNA causados por agentes alquilantes em células de roedores (MAZZORANA et al., 2013).

Sendo assim, existe a necessidade de estudos complementares para que sejam estabelecidos os reais efeitos quanto à genotoxicidade dos extratos realizados com *Mikania glomerata*. Há também uma expectativa de que diferentes formulações e processos extrativos utilizando a *Mikania glomerata* que priorizem a extração da cumarina e, com isso reduzam a concentração de outros componentes, possam diminuir a ocorrência dos possíveis efeitos tóxicos e genotóxicos ou até mesmo potencializar os possíveis efeitos protetores advindos deste vegetal e de seus metabólitos.

2.3 Nanoformulações

A nanotecnologia pode ser resumidamente definida como a área de estudo e desenvolvimento de materiais com dimensões nanométricas. O intuito desta ciência é fornecer uma melhor compreensão dos fenômenos e dos materiais provenientes da nano escala, o que envolve a caracterização, a síntese e a aplicação destes materiais, estruturas e dispositivos (SILVA, 2013).

Desde seu surgimento, ano após ano, houve aumento nos investimentos financeiros nesta área, na esperança de que os nanomateriais solucionem limitações das tecnologias já existentes (MARUNO, 2009; PAUNESKU et al., 2003). Esta ciência tem contribuído para o aperfeiçoamento de diversas propriedades farmacológicas de fármacos convencionais, produzindo uma série de vantagens, como maior estabilidade, características organolépticas favoráveis, maior poder de penetração por membranas, maior biodisponibilidade, incremento da solubilidade para substâncias pouco solúveis, liberação controlada de substâncias e até mesmo a

capacidade de evitar o efeito de primeira passagem sofrido por algumas substâncias no fígado (IRACHE et al., 2011; YAO; XIAO; MCCLEMENTS, 2014).

Neste contexto, um dos materiais mais promissores da atualidade são as nanodispersões, que possuem grande potencial de aplicação em diversas áreas da indústria, incluindo a de produtos farmacêuticos (WANG et al., 2009).

As nanodispersões são formadas por sistemas micelares que por sua vez, são um conjunto de moléculas de tensoativos que se agrupam de forma espontânea gerando agregados coloidais nanoestruturados em meio aquoso com tamanho de partícula usualmente compreendido entre 30-300nm (Figura 3). Este sistema utilizado como transportador de fármacos é capaz de fornecer um conjunto de vantagens superior a outros sistemas de entrega como: a solubilização de fármacos pouco solúveis, aumentando sua biodisponibilidade; capacidade de permanecer em circulação sistêmica por maior período de tempo, proporcionando acúmulo gradual do fármaco na área requerida e acumulação do fármaco em regiões com vascularização reduzida devido às dimensões reduzidas das partículas. A partícula em forma micelar, ainda possui a capacidade de proteger o fármaco contra possível inativação sob o efeito de um ambiente biológico, reduzindo efeitos colaterais indesejáveis, com consequente incremento na biodisponibilidade (HUSSEINI; PITT, 2008; TORCHILIN, 2001; ZHANG et al., 2011).

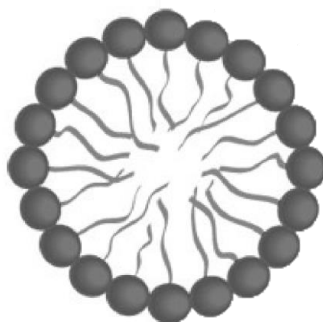


Figura 3: Ilustração esquemática de nanopartícula composta de tensoativos. Fonte: (HUSSEINI; PITT, 2008)

Frequentemente são utilizados agentes tensoativos no preparo das dispersões com a finalidade de estabilizar cineticamente o sistema. Os agentes tensoativos são moléculas com propriedades anfífilas que ao se adsorverem na interface entre as fases, diminuem a tensão superficial e assim promovem a formação das partículas

reduzindo a possibilidade de coalescência (FERNANDES, 2014; JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015).

Os agentes tensoativos são moléculas que combinam grupos hidrofílicos e lipofílicos e o equilíbrio destas forças é expresso por um valor numérico denominado equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL). O conhecimento deste parâmetro é indispensável para a escolha dos tensoativos, como também para determinar a proporção destes, de forma a obter maior eficiência no preparo das dispersões (PASQUALI; TAUROZZI; BREGNI, 2008).

As nanopartículas possuem a capacidade de aumentar significativamente a biodisponibilidade de substâncias lipofílicas encapsuladas dentro de suas partículas (MCCLEMENTS, 2011). A redução do tamanho das partículas para valores inferiores 500nm, pode produzir uma maior absorção da substância ativa e maior captação de partículas pelo organismo. Sugerindo que a absorção da nanopartículas é um fator importante na melhoria da biodisponibilidade (ACOSTA, 2009).

De acordo com a literatura, nanopartículas contendo água, Purity gum 2000, triacilglicerol de cadeia média e óleo de hortelã apresentaram maior atividade antimicrobiana para *Listeria monocytogenes* Scott A e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 quando comparado ao óleo puro (LIANG et al., 2012). Outro estudo também utilizando nanopartículas demonstrou maior efetividade da nanoformulação, contendo água, Tween 20, Span 80, óleo de andiroba e aroeira no tratamento *in vitro* de *Trypanosoma evansi* (BALDISSERA et al., 2013). Ainda descrevendo as possíveis aplicações para as nanoformulações, foi demonstrado que a administração nasal de nanopartículas contendo Tween 80, etanol, cloreto cetilpiridínio, óleo de soja, água e um antígeno pode gerar resposta imune humoral e celular, induzindo a expressão de MHC de classe II, a expressão de moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 e maturação de células dendríticas (BIELINSKA et al., 2014).

Diversos estudos apontam benefícios na utilização de nanoformulações como veículo para larvicidas, inseticidas e transportadores de nutrientes lipofílicos, o que reforça a versatilidade e o potencial desta formulação (FERNANDES et al., 2014; QIAN et al., 2012; SUGUMAR et al., 2014). Desta forma, nanodispersões contendo cumarinas provenientes do extrato de *Mikania glomerata* podem possuir maior efetividade devido a maior capacidade de absorção das nanoformulações, por parte

do organismo. Uma outra possibilidade é que nanopartículas possam ser capazes de extrair componentes lipofílicos diretamente de plantas, não sendo necessária prévia extração com solvente orgânico, resultando em uma formulação mais eficiente com menor custo quando comparada a outros sistemas nanoestruturados.

2.4 Mutagenicidade

As mutações podem ocorrer devido a um evento espontâneo ou decorrente da interação do material genético com agentes físicos, químicos ou biológicos. O acúmulo destas alterações pode interferir em processos vitais das células como a duplicação e a expressão gênica, gerando alterações cromossômicas, instabilidade genômica e câncer (ARALDI et al., 2015; LOURENÇO et al., 2010).

O câncer é considerado uma das principais causas de morte entre humanos, somente no ano de 2012, em todo o mundo, foram relatados 14,1 milhões de novos casos de câncer, 32,6 milhões de pessoas vivendo com câncer e 8,2 milhões de mortes por câncer. O processo de desenvolvimento do câncer é complexo e envolve diversas fases, no entanto alterações genéticas e epigenéticas estão envolvidas nas fases iniciais do seu desenvolvimento (FERLAY et al., 2013; KANG et al., 2013; TURRINI; FERRUZZI; FIMOIGNARI, 2015).

A primeira fase do desenvolvimento do câncer, chamada de iniciação, é exatamente quando ocorrem danos irreversíveis e permanentes ao DNA de uma célula alvo, resultantes, por exemplo, da interação do material genético da célula com agentes mutagênicos; no entanto, estas alterações ainda não provocam alterações fenotípicas. Nas etapas seguintes (promoção, progressão e carcinogênese) ocorrerá a expansão clonal das células inicialmente alteradas com expressão fenotípica das mutações adquiridas na etapa de iniciação, culminando na multiplicação descontrolada das células e na manifestação clínica do câncer (PITOT; DRAGAN, 1991; PITOT, 1993).

Apesar da gravidade que esta doença representa, verificam-se estágios intermediários entre células normais e malignas, bem como desenvolvimento lento, com fases capazes de durar anos antes que os sintomas surjam. A existência deste

longo período de latência permite a utilização de substâncias capazes de bloquear ou atrasar este processo, evitando assim o desenvolvimento do câncer (TURRINI; FERRUZZI; FIMOGNARI, 2015).

2.5 Antimutagenicidade

Existem evidências de que as mutações em células somáticas desempenham um papel na patogênese de doenças degenerativas crônicas, como aterosclerose e doenças cardíacas, além de estarem relacionadas ao processo de carcinogênese, uma das principais causas de morte dos humanos. Contudo, a prevenção do câncer e de outras doenças relacionadas a mutações podem ser alcançadas propiciando a ingestão de fatores de proteção, fortalecendo os mecanismos fisiológicos de defesa e evitando a exposição a agentes cancerígenos conhecidos (DE FLORA, 1998).

O termo quimioprevenção surge neste contexto e pode ser definido como a prevenção, inibição ou reversão da carcinogênese através da administração ou ingestão de um ou mais compostos químicos, sejam eles medicamentos ou compostos de origem natural. A quimioprevenção do câncer se dá por pelo menos dois mecanismos importantes e um deles é antimutagênese. Este processo inclui a inibição da absorção de substâncias cancerígenas, a desativação/desintoxicação de substâncias carcinogênicas, o bloqueio de ligações de DNA-agente carcinogênico, e a melhoria dos mecanismos de reparo do DNA (NAMASIVAYAM, 2011).

Por sua vez, a antimutagênese é classicamente subdividida em dois processos maiores e generalistas, denominados desmutagênese e bioantimutagênese. Na desmutagênese os agentes protetores conhecidos como desmutágenos, atuam na inativação química e enzimática de agentes mutagênicos, na inibição da ativação metabólica dos pró-mutágenos, ou na inativação de moléculas reativas. Em contrapartida, na bioantimutagênese os agentes atuam na região intracelular, modulando processos de reparo e replicação do DNA danificado, resultando em diminuição na frequência de mutações (DASHWOOD, 2002; KADA; MORITA; INOUE, 1978).

Em resumo, os agentes antimutagênicos podem impedir a interação de mutágenos com o DNA, seja por inativação química ou enzimática, ou reduzindo os efeitos adversos dos agentes mutagênicos através da modulação das alterações celulares induzidas após os danos já estarem estabelecidos (BUNKOVA; MAROVA; NEMEC, 2005). Desta forma, é de grande importância a utilização de ensaios de antimutagenicidade na investigação de compostos com atividade antimutagênica para que novas substâncias com tal potencial sejam descobertas (SŁOCZYŃSKA et al., 2014).

2.6 Teste do micronúcleo

Os testes de mutagenicidade e antimutagenicidade constituem uma parte importante na avaliação toxicológica de compostos químicos que possuem a capacidade de interagir com o material ou mecanismos genéticos, e podem induzir ou prevenir danos celulares. A este respeito, o teste do micronúcleo tem sido extensamente utilizado na avaliação da genotoxicidade, tanto *in vitro* como *in vivo*. O teste *in vivo* utilizando eritrócitos policromáticos da medula óssea é considerado um dos melhores ensaios citogenéticos no campo da toxicologia genética, pois permite a consideração de fatores do metabolismo do organismo, da farmacocinética e dos processos de reparação do DNA. A avaliação da frequência de micronúcleos *in vivo* é também um dos principais testes de genotoxicidade recomendado pelos órgãos reguladores em todo o mundo como parte da avaliação de segurança de novos medicamentos (FENECH, 2005; KRISHNA; HAYASHI, 2000).

Os micronúcleos estão presentes em células que sofreram quebras cromossômica e, por falta de centrômeros, geram fragmentos acêntricos (clastogenicidade) ou mesmo por cromossomos inteiros que não possuem a capacidade de migrar para os pólos do fuso durante a divisão mitótica (aneugenicidade) (Figura 4). Posteriormente, na telófase, se forma um envelope nuclear em torno dos cromossomos e/ou dos fragmentos de cromossomos, que, de forma gradual assumem a morfologia de um núcleo comum com a única diferença de serem menores do que o núcleo principal da célula, deste fato vem o termo micronúcleo (FENECH, 2005).

A medula óssea é definida como região alvo na identificação de micronúcleos por possuir uma população de células que estão em constante divisão, completando um ciclo de divisão celular em 22 a 24 horas. Desta forma, é parte fundamental no processo de formação do micronúcleo o processo de produção de eritrócitos conhecida como eritropoiese (FAGUNDES; OLIVEIRA; VALADRES, 2005; KRISHNA; HAYASHI, 2000).

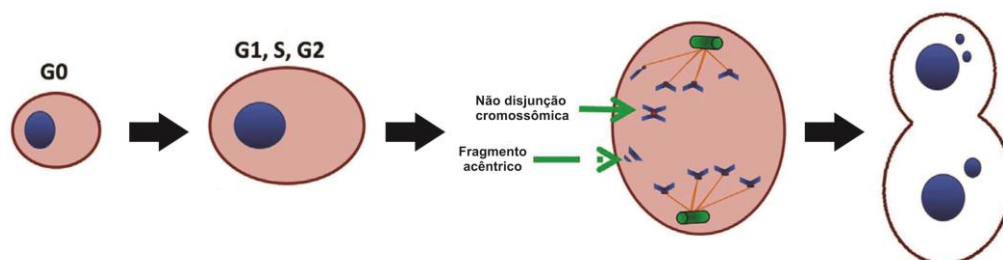


Figura 4: Formação de células micronucleadas. Fonte: adaptado de ARALDI et al., 2015

As células-tronco formam a base da eritropoiese com as fases de proliferação e maturação dos eritrócitos, a qual, em roedores adultos, ocorre tanto da medula óssea quanto no baço. Durante a proliferação, as células continuam sua divisão, momento em que um determinado mutágeno pode atuar e causar danos nos cromossomos e nas macromoléculas relacionadas com a disjunção das cromátides. Durante a maturação, o eritroblasto expulsa seu núcleo principal para formar o eritrócito policromático, que por possuir RNA, é identificado por sua coloração basofílica (Figura 5). Durante este processo o micronúcleo pode não ser expulso, sendo visualizado de forma clara no citoplasma da célula. (KRISHNA; HAYASHI, 2000)

Nos testes de mutagenicidade, o aumento da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) (Figura 6), em animais tratados com determinada substância, mostra que a substância administrada induziu danos cromossômicos resultantes de eventos clastogênicos ou aneugênicos, que podem ser associados ao surgimento ou evolução de tumores. Entretanto, a redução da frequência de MNPCE em animais tratados com uma substância reconhecidamente mutagênica, mutágeno, associada a uma outra substância, substância teste, sugere que a substância teste atua protegendo o DNA contra possíveis danos, reduzindo a frequência de

mutações, podendo assim, ser considerada antimutagênica (DELARMELINA, 2012; KRISHNA; HAYASHI, 2000)

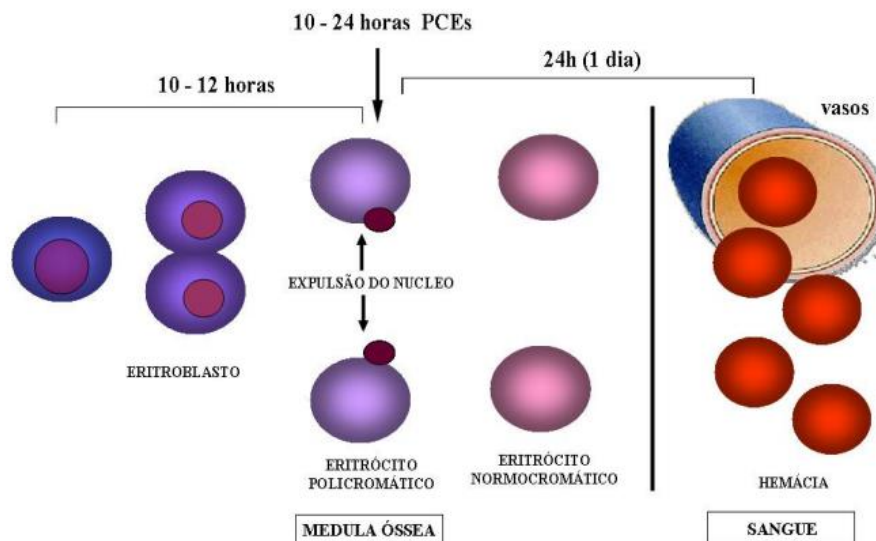


Figura 5: Representação esquemática do processo de maturação dos eritrócitos na medula óssea.
Fonte: (DELARMELINA, 2012)

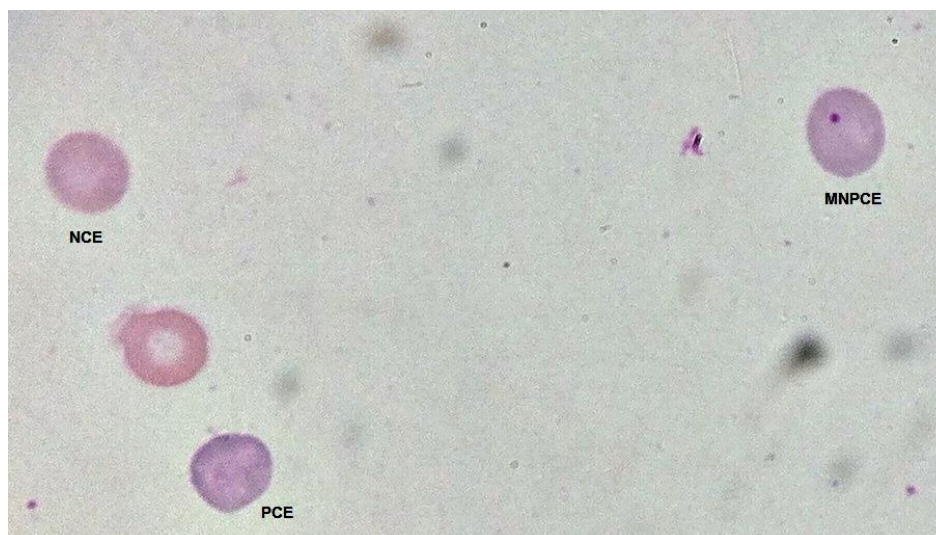


Figura 6: Fotomicrografia do eritrócito policromático micronucleado (MNPCE), eritrócito policromático (PCE) e eritrócito normocromático (NCE). (Aumento de 1000X) Fonte: Acervo pessoal.

O ensaio de micronúcleo fornece o índice de mutagenicidade, indicado pela análise de frequência de MNPCE, como também permite verificar o índice de citotoxicidade de substâncias por meio da análise da frequência de PCE em relação ao total de eritrócitos (PCE+NCE) de grupos de animais tratados e os grupos controle, em que

a citotoxicidade é indicada pela redução acentuada na percentagem de PCE (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

As pesquisas ao longo dos últimos anos sugerem que a utilização contínua de substâncias antimutagênicas na dieta humana será o procedimento mais eficaz para a prevenção do câncer e de doenças genéticas. Devido a isso, espera-se que a busca por novos compostos com atividade antimutagênica seja o foco de muitas pesquisas no futuro próximo, bem como os mecanismos de ação e novas formas de utilização dos compostos mais ativos (FERGUSON, 1994; SŁOCZYŃSKA et al., 2014).

Nesse sentido, o presente trabalho apresenta uma triagem inicial, *in vivo*, para a avaliação do extrato etanólico de *Mikania glomerata*, como possível agente protetor do material genético contra aos danos induzidos pelo quimioterápico ciclofosfamida, e uma comparação das atividades antimutagênicas entre o extrato etanólico e a nanodispersão contendo cumarinas extraídas do guaco.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimutagênica da nanodispersão e do extrato etanólico obtidos a partir de *Mikania glomerata* Sprengel, por meio do ensaio do micronúcleo *in vivo*, em medula óssea de camundongos (*Mus musculus*).

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar as nanodispersões (desenvolvidas para o estudo), a fim de selecionar a formulação mais promissora para os testes de atividade biológica;
- ✓ Quantificar as concentrações de cumarina no extrato etanólico e na nanodispersão, para utilização nos ensaios;
- ✓ Investigar o efeito do extrato etanólico e da nanodispersão de *Mikania glomerata*, contra a citotoxicidade induzida por ciclofosfamida no protocolo de tratamento simultâneo;
- ✓ Avaliar, por meio do teste de micronúcleo *in vivo*, o efeito antimutagênico do extrato etanólico e da nanodispersão de *Mikania glomerata*, utilizando o protocolo de tratamento simultâneo;
- ✓ Comparar os resultados obtidos nas análises realizadas com as duas formulações;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Botânico

As partes aéreas de *Mikania glomerata* utilizadas no estudo foram obtidas por meio de coletas na Fazenda Experimental do Instituto Capixaba de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural – INCAPER, localizada no município de Viana/ES. Posteriormente à coleta, o material vegetal foi submetido à secagem em estufa com circulação de ar, à 40°C, e após completamente secas, foram pulverizadas utilizando-se moedor elétrico. Exsicata do material foi confeccionada e encontra-se sob registro 37997 no herbário VIES da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, ES, Brasil.

4.2 Obtenção das nanodispersões (ND)

As etapas envolvidas na produção, análise de estabilidade e caracterização das nanodispersões utilizadas no presente estudo foram, gentilmente, realizadas pelo Prof. Dr. Caio Pinho Fernandes, do Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica, da Universidade Federal do Amapá, em colaboração com o Prof. Dr. Hildegardo Seibert França do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, Campus Vila Velha.

Diferentes formulações foram obtidas variando-se as concentrações de água, dos tensoativos monooleato de polietilenoglicol 400 (MP400) e Dioleato de polietilenoglicol 400 (DP400) em proporções previamente fixadas (Tabela 1). Esses tensoativos têm sido utilizados pelo grupo com alto índice de formação de partículas com tamanho inferior a 200 nm. Aparentemente, eles atuam como plastificantes, formando um filme que facilita a estabilização do sistema. A dispersão aquosa de tensoativos foi preparada mediante agitação magnética (500rpm) da mistura de MP400/DP400 em água, por 10 minutos. Em seguida, foi feita a extração da droga vegetal com a dispersão aquosa de tensoativos (1:100) sob agitação magnética

(500rpm) por 24 horas. Após esse período, foi realizada a filtração por gravidade utilizando papel de filtro, para remoção do material vegetal e obtenção das nanodispersões à base de *Mikania glomerata*. Todas as formulações foram acondicionadas sob temperatura ambiente e as análises realizadas em triplicata.

Tabela 1: Proporção relativa dos constituintes das diferentes dispersões aquosas de tensoativos empregadas na preparação das nanodispersões de *Mikania glomerata*

Formulação	Água	MP400	DP400
1	90,00	5,00	5,00
2	91,25	3,75	5,00
3	91,25	5,00	3,75
4	92,50	3,75	3,75
5	92,50	2,50	5,00
6	92,50	5,00	2,50
7	93,75	2,50	3,75
8	93,75	3,75	2,50
9	95,00	2,50	2,50

4.2.1 Caracterização de nanopartículas

A caracterização de nanopartículas (tamanho e carga de superfície) é de fundamental importância para o desenvolvimento e aplicação das formulações. No entanto, estas medidas de caracterização e quantificação das nanopartículas são um desafio, uma vez que são afetados pelo tamanho e natureza das partículas, pela concentração da amostra, pelas propriedades da solução e pelos princípios fundamentais dos métodos aplicados (DOMINGOS et al., 2009).

Entre os diversos métodos existentes de caracterização de nanopartículas, foram realizados os seguintes métodos: Dispersão Dinâmica de Luz (DLS), que possui o objetivo de medir o diâmetro hidrodinâmico médio e do índice de polidispersão (Pdi) das partículas e o Potencial Zeta, que é utilizado para determinar a carga superficial das partículas. Este último parâmetro reflete o potencial de superfície das partículas que é influenciado por mudanças na interface com o meio dispersante. Um valor

relativamente elevado ($> \pm 20\text{mV}$) é um indicativo de boa estabilidade físico-química da formulação (SCHAFFAZICK et al., 2003).

As nanodispersões a base de *Mikania glomerata* foram analisadas utilizando-se equipamento Zetasizer 5000 (Malvern, UK). As amostras foram diluídas em água purificada (1:25) e as medidas feitas em triplicata. Os resultados foram expressos em função da média e desvio padrão (COSTA et al., 2014).

4.2.2 Análise espectrofotométrica

A análise qualitativa para verificação da presença dos marcadores químicos do guaco foi realizada por método espectrofotométrico (SILVA et al., 2008). Alíquotas de 2 mL das nanodispersões à base de guaco foram submetidas a extração com 8 mL de clorofórmio. Após vigorosa agitação em agitador do tipo vortex pelo período de 1 minuto, foi feita a separação da fração clorofórmica da fração aquosa utilizando-se um funil de separação. A fração orgânica foi diluída com clorofórmio (qsp 10 mL) e foi feita a varredura da solução orgânica no intervalo de comprimento de onda entre 200-400nm. O branco para análise de cada formulação foi feito mediante solubilização do par de tensoativos empregados, na proporção apropriada, com clorofórmio.

4.2.3 Cromatografia em fase gasosa

A identificação de cumarina nas nanodispersões foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrômetro de massa (CG-EM). As análises foram efetuadas em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa Shimadzu GCMS - QP5050A, equipado com injetor *split/splitless*, operando no modo *splitless*. Para a realização da análise foi empregada uma coluna DB-5MS, utilizando nitrogênio como gás de arraste. A temperatura do forno variou de 80°C até 200°C com taxa de aquecimento de 12°C/ min.

4.3 Preparo do Extrato Etanólico (EE)

O material pulverizado foi submetido a maceração em etanol:água (70:30 v/v), a temperatura ambiente (25 a 30°C), e ao abrigo da luz, por 72 horas. Após esse período, o material foi filtrado e o solvente foi evaporado utilizando evaporador rotativo sob pressão reduzida a 60°C. Após rotaevaporação, o extrato permaneceu em estufa a 60°C até completa secagem. Os extratos foram mantidos sob refrigeração até o momento da realização dos protocolos experimentais.

4.4 Doseamento de Cumarina

Os teores de cumarina foram quantificados no extrato etanólico e na nanodispersão produzidos a partir das partes aéreas de *Mikania glomerata*, segundo a metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira 4ª edição, parte 2, fascículo 6, com modificações (BRASIL, 2005). Para o extrato etanólico foi pesado 10,5mg e diluído em 1mL de Metanol (MeOH), posteriormente foi realizada a centrifugação e filtração em membrana de celulose de 0,45µm. Para a nanodispersão foi realizada extração prévia da cumarina com diclorometano, sendo adicionado 2mL da nanodispersão em um balão de separação e adicionado 5mL de diclorometano. Após agitação e separação das fases, a fase contendo diclorometano foi reservada. Foi adicionado mais 5mL de diclorometano e o procedimento foi repetido.

Após a extração o diclorometano foi evaporado a temperatura ambiente e a cumarina extraída foi diluída em 2mL de metanol. Foi utilizado 20µL de cada formulação para a injeção em equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As análises foram realizadas em Sistema Waters Breeze equipado com bomba Waters 1525 binary HPLC e sistema de detecção UV/VIS Waters 2489. Foi utilizada coluna Supelco Nucleosil® C18 (250 x 3,2 mm, 5 µm), fluxo de 0,5mL.min⁻¹, detecção UV_{275nm} e eluição isocrática (H₂O-MeOH 53:47). A quantificação da cumarina foi realizada utilizando padrão externo (1,2-benzopirona - Sigma-Aldrich). Para a construção da curva de calibração preparou-se soluções com concentrações de 0,0156; 0,0312; 0,0625; 0,125; 0,25; e 0,50mg.mL⁻¹, que foram

injetadas em triplicata. A partir da equação da reta obtida com a curva de calibração foi possível calcular a concentração de cumarina no extrato etanólico e na nanodispersão.

4.5 Ensaio do micronúcleo em medula óssea de camundongos

O ensaio do micronúcleo foi conduzido baseado no protocolo descrito por Krishna e Hayashi, (2000) com algumas adaptações, e de acordo com os de princípios éticos de experimentação animal do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA/UFES, processo 018/2015, ANEXO A).

4.5.1 Agente indutor de danos ao DNA

Para a indução de danos ao material genético utilizou-se o agente alquilante de ação indireta ciclofosfamida (CPA) ($C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$ - Sigma-Aldrich). A CPA é um quimioterápico que possui ativação metabólica no fígado e seus metabólitos provocam potente ação mutagênica. A administração foi realizada por via intraperitoneal (ip) na dose de $50mg.kg^{-1}$ de massa corpórea (m.c), diluído em solução salina (NaCl 0,9%).

4.5.2 Extrato etanólico e nanodispersão

A dose diária de cumarina recomendada para humanos varia de 0,5 a 5,0mg. A escolha das doses do extrato etanólico de *Mikania glomerata* foi baseada na dose clínica de 0,5mg de cumarina, que é a dose diária mínima recomendada para humanos. As concentrações finais foram de $0,25mg.kg^{-1}$, $0,50mg.kg^{-1}$ e $1,00mg.kg^{-1}$, correspondentes, respectivamente, à 1/2, 1 e 2 vezes a dose clínica mínima diária preconizada para humanos (BRASIL, 2014).

As doses da nanodispersão foram definidas de acordo com a capacidade de extração da nanoformulação. Sendo assim, as doses finais foram de $0,004\text{mg.kg}^{-1}$ e $0,008\text{mg.kg}^{-1}$, correspondentes, respectivamente, à 1 e 2 vezes a concentração de cumarina extraída no processo. Devido a capacidade de extração da nanodispersão e para a melhor comparação dos efeitos entre as formulações, também foram testadas as doses de $0,004\text{mg.kg}^{-1}$ e $0,008\text{mg.kg}^{-1}$ para o extrato etanólico.

4.5.3 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* (*Mus musculus*) com idade entre 6 e 8 semanas e aproximadamente 30g m.c, selecionados aleatoriamente e fornecidos pelo Biotério Central da UFES. Os animais foram mantidos agrupados em gaiolas plásticas, em sala climatizada sob temperatura constante, com ciclo claro-escuro de 12 horas. O regime alimentar foi o clássico, com ração comercial padrão e água fornecida *ad libitum*. Antes do início dos tratamentos, os camundongos foram aclimatados ao local de experimentação por uma semana.

4.5.4 Delineamento dos Experimentos de Antimutagenicidade

Foi realizado um protocolo de antimutagenicidade (tratamento simultâneo), com 10 grupos experimentais. Cada grupo contendo 6 animais selecionados aleatoriamente conforme apresentado no Quadro 1.

Os tratamentos foram realizados por via oral (gavage), uma vez que é a forma administrada clinicamente, com exceção da Ciclofosfamida, no qual a administração foi realizada por via intraperitoneal. A avaliação da antimutagenicidade do extrato e da nanodispersão preparadas com *Mikania glomerata* como agente protetor e/ou reparador do material genético foi realizada utilizando-se os protocolos de tratamento simultâneo, frente ao agente mutagênico Ciclofosfamida. O cálculo do tamanho da amostra foi baseado no estudo apresentado por Scheibe (2008) que determina o número de animais necessários para alcançar significância para $p < 0,05$

para várias diferenças entre o grupo controle e o tratado, com coeficiente de variação (CV) de 15% ou 20% (SCHEIBE, 2008).

Quadro 1: Grupos Experimentais

Grupo	n	Tratamento
Controle Negativo (CN)	6	NaCl 0,9%
Controle Positivo (CP)	6	Ciclofosfamida (CPA) (50mg.kg ⁻¹)
Controle Solvente (CS)	6	Nanodispersão de tensoativos + CPA ip
Extrato 1,00mg.kg ⁻¹	6	Extrato 1,00mg.kg ⁻¹ de cumarina + CPA ip
Extrato 0,50mg.kg ⁻¹	6	Extrato 0,50mg.kg ⁻¹ de cumarina + CPA ip
Extrato 0,25mg.kg ⁻¹	6	Extrato 0,25mg.kg ⁻¹ de cumarina + CPA ip
Extrato 0,008mg.kg ⁻¹	6	Extrato 0,008mg.kg ⁻¹ de cumarina + CPA ip
Extrato 0,004mg.kg ⁻¹	6	Extrato 0,004mg.kg ⁻¹ de cumarina + CPA ip
Nanodispersão 0,008mg.kg ⁻¹	6	Nanodispersão 0,008mg.kg ⁻¹ de cumarina + CPA ip
Nanodispersão 0,004mg.kg ⁻¹	6	Nanodispersão 0,004mg.kg ⁻¹ de cumarina + CPA ip

4.5.5 Tratamento simultâneo

Para a realização do experimento seguindo o protocolo denominado tratamento simultâneo, o qual objetivou a exposição simultânea do organismo teste ao mutágeno e à substância a ser testada, o extrato ou a nanodispersão, em suas respectivas concentrações, foram administrados em dose única, seguida da aplicação da CPA (50mg.kg⁻¹m.c., ip). Vinte e quatro horas após a administração das drogas, os animais foram eutanasiados. O grupo CN foi tratado com uma dose única de solução salina (NaCl 0,9%) e o grupo CS foi tratado com dose única de nanodispersão de tensoativos (sem a extração com *M. glomerata*) e a eutanásia foi realizada 24 horas após o tratamento.

4.6 Preparação citológica e análise

A eutanásia dos animais foi realizada por deslocamento cervical, com posterior retirada de ambos os fêmures de cada camundongo. Imediatamente após a eutanásia realizou-se a retirada das epífises distais de cada fêmur para realização da coleta da medula óssea do interior de cada fêmur com o auxílio de uma seringa previamente preenchida com 0.5mL soro fetal bovino. As amostras de medulas foram coletadas em um tubo falcon e, posterior a isso, o material de cada tubo, devidamente identificado, foi centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm, por duas vezes, descartando-se o sobrenadante. Foram confeccionadas 2 lâminas para cada animal dos grupos experimentais através do método de esfregaço.

Após secagem à fresco, as lâminas foram fixadas em metanol por 10 minutos e coradas com Leishman, para a diferenciação das células sanguíneas, principalmente os eritrócitos policromáticos (PCE), eritrócitos normocromáticos (NCE) e eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE), parâmetros das análises.

As lâminas foram analisadas em teste cego, utilizando microscópio óptico com aumento de 1.000x. A antimutagenicidade, frente aos danos causados pela CPA, foi avaliada através da análise de 2000 PCEs por animal (1000 por lâmina), anotando-se as frequências de MNPCEs. A ação protetora contra os efeitos citotóxicos da CPA foi avaliada pela razão de PCE no total de 400 eritrócitos (PCE + NCE), pela fórmula $PCE/(PCE+NCE)$. Toda a análise obedeceu aos critérios estabelecidos por Krishna e Hayashi (2000).

A porcentagem de redução de danos (diminuição da frequência média de MNPCE), nas diferentes concentrações e protocolos, foi calculada de acordo com Serpelone et al. (2008), usando a fórmula:

$$\% \text{ Redução} = \frac{\text{frequência de MNPCEs em A} - \text{frequência de MNPCEs em B}}{\text{frequência de MNPCEs em A} - \text{frequência de MNPCEs em C}} \times 100$$

Onde “A” é o grupo de células tratadas com CPA; “B” é o grupo de células tratadas com a dose da substância teste e CPA; e “C” o grupo controle negativo (NaCl 0,9%).

A análise estatística foi realizada por meio de Análise de Variância (ANOVA) seguida teste a posteriori de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$) para as diferenças estatísticas significativas. Para avaliar a normalidade dos resultados obtidos foi aplicado o teste de Kolmogorof-Smirnoff. Todos os testes foram realizados com o auxílio do software Assistat 7.7 beta.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Nanodispersões de tensoativos

5.1.1 Caracterização de nanopartículas

As formulações obtidas apresentaram aspecto esverdeado (Figura 7), miscibilidade em água e pH entre 5,0 – 5,8. Também se mostraram translúcidas e com reflexo azulado, relacionado ao efeito Tyndall (efeito óptico de dispersão da luz provocado por partículas de uma dispersão coloidal). Essas duas últimas características são típicas para nanodispersões, sendo reconhecidas como um indício macroscópico da formação de micelas em escala nanométrica (FORGIARINI et al., 2000).



Figura 7: Aspecto das nanodispersões à base de *Mikania glomerata*. Fonte: Acervo pessoal.

A Tabela 2 mostra os valores de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta das dispersões obtidas. Observou-se que a maioria das formulações apresentaram tamanho de partícula ideal, o que indica que o processo de obtenção

foi eficiente. Apenas as formulações 7 e 8 apresentaram tamanho médio de partícula acima do ideal, com tamanho superior a 300nm. Nanodispersões são sistemas promissores para carreamento de fármacos, devido a sua possibilidade de incorporação de substâncias de baixa solubilidade em água, aumento da estabilidade química e física, aumento da absorção, biodisponibilidade, entre outros. Caracterizando-se pelo baixo tamanho de partícula, usualmente compreendido entre 30-300nm (ZHANG et al., 2011).

Tabela 2: Caracterização das nanodispersões à base de *Mikania glomerata*.

Formulação	Tamanho de partícula (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)
1	279,0±3,236	0,275±0,017	-31,4±0,04649
2	223,2±2,250	0,286±0,012	-30,6±0,06986
3	258,4±3,721	0,306±0,010	-28,2±0,09371
4	258,6±1,858	0,304±0,047	-32,7±0,04786
5	289,2±2,219	0,246±0,009	-30,9±0,05292
6	251,8±1,345	0,249±0,003	-31,0±0,09430
7	332,3±0,500	0,250±0,016	-30,0±0,01850
8	426,0±20,95	0,520±0,028	-10,5±0,06644
9	274,1±0,603	0,293±0,009	-29,5±0,01026

A distribuição do tamanho de partícula é um dos principais parâmetros relacionados a estabilidade de nanodispersões. Neste contexto, destaca-se a nanodispersão 2, que além de menor diâmetro médio, apresentou baixo índice de polidispersão. Esse dado sugere uma distribuição monomodal e alta homogeneidade de partículas, o que está de acordo com nanosistemas estáveis. Altos valores (em módulo) de potencial zeta também sugerem estabilidade do sistema (KELMANN et al., 2007). Desta forma, a nanodispersão 2 foi selecionada para a realização da avaliação do potencial antimutagênico *in vivo*.

5.1.2 Análise espectrofotométrica

A análise espectrofotométrica qualitativa de cumarina mostrou a presença de picos com comprimento de onda máximo (λ_{max}) em 274 e 310nm (Figura 8A), tipicamente associados a cumarinas, o que não foi observado na análise do branco da formulação (Figura 8B), sugerindo que houve a extração dos marcadores químicos.

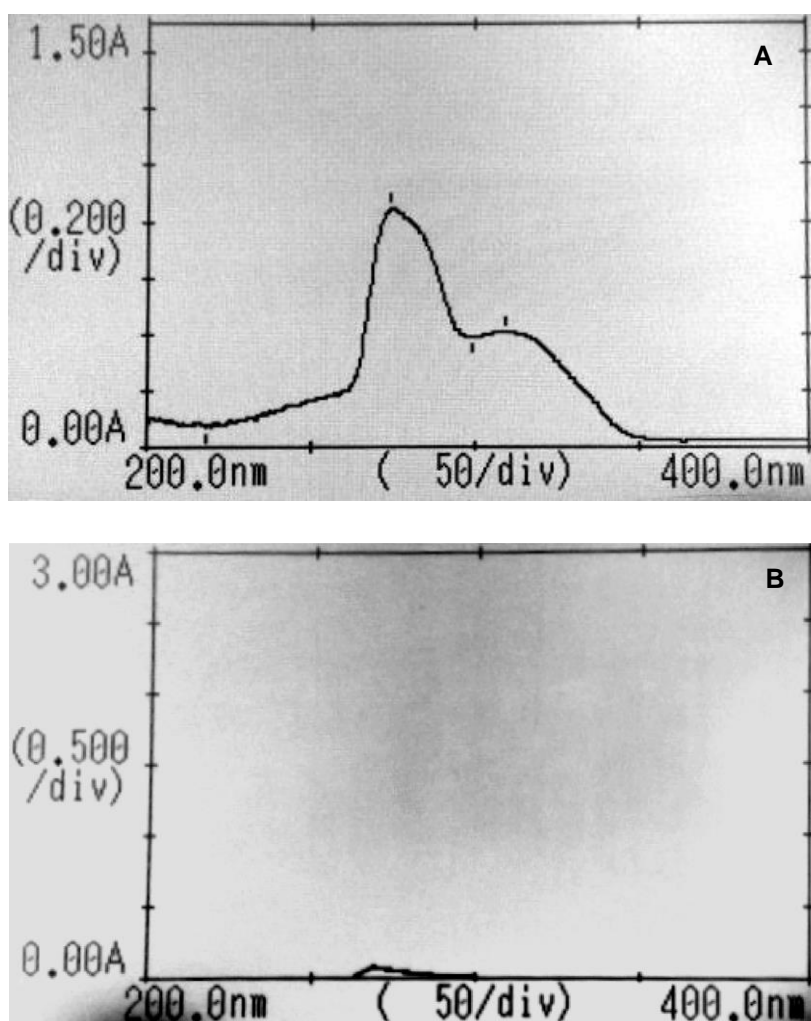


Figura 8: Espectro obtido por espectrofotometria após análise da nanodispersão (A) e espectro obtido após análise do branco da formulação (B). Fonte: Acervo pessoal.

5.1.3 Cromatografia em fase gasosa

Nas análises por CG/EM com a nanodispersão observou-se a presença de cumarina no tempo de retenção e padrão de fragmentação igual ao padrão de cumarina (FIGURAS 9 e 10). Através desta técnica foi possível confirmar a presença do marcador químico na nanodispersão e verificar a capacidade de extração da formulação.

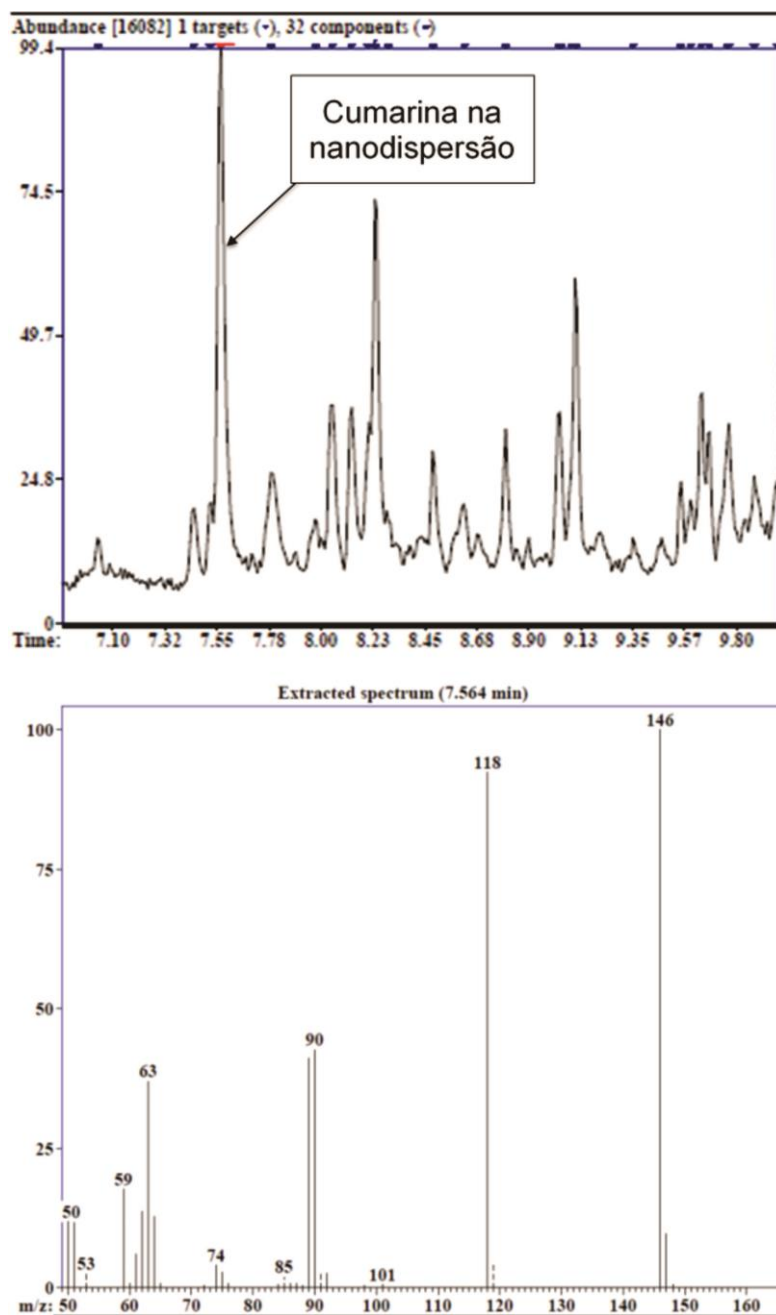


Figura 9: Cromatograma da nanodispersão de *M. glomerata* com a respectiva fragmentação comparando com a biblioteca NIST. Fonte: Acervo pessoal.

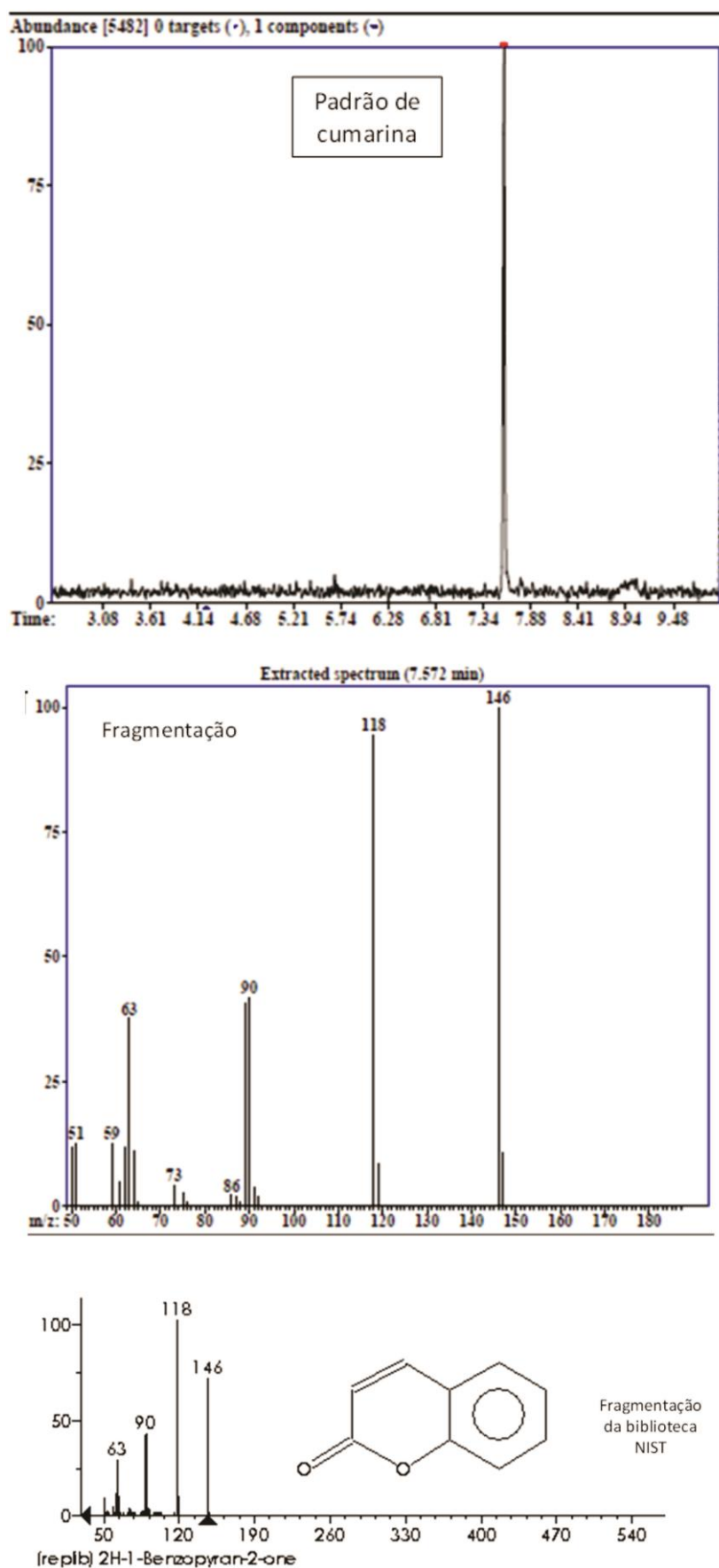


Figura 10: Cromatograma do padrão de cumarina com a respectiva fragmentação comparando com a biblioteca NIST. Fonte: Acervo pessoal.

A solubilização de fármacos com nanodispersões tem sido considerada potencialmente útil na preparação de medicamentos inovadores. Os medicamentos desenvolvidos com a aplicação destas tecnologias apresentam alto índice de eficiência no tratamento de diversas doenças, principalmente em doenças tumorais. Essa eficiência é atribuída principalmente à melhora na biodisponibilidade, na farmacocinética, na eficácia e segurança das substâncias ativas (HAFNER et al., 2014; WANG et al., 2009).

Considerando que fitoterápicos empregam drogas vegetais com constituição química complexa, o desenvolvimento de uma técnica capaz de gerar uma nanodispersão diretamente após a extração se configura como algo extremamente inovador. Os resultados do presente estudo sugerem que a extração de *Mikania glomerata* com dispersão aquosa de tensoativos não iônicos foi capaz de gerar nanodispersões com boas características físicas, permitindo a obtenção de um fitoproduto nanobiotecnológico à base de uma importante droga vegetal.

5.2 Quantificação de cumarina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Após a realização da análise cromatográfica, observou-se que o extrato etanólico e a nanodispersão apresentaram tempo de retenção de aproximadamente 13 minutos (Figura 12B e C), condição que foi similar à observada para o padrão de cumarina, por meio da comparação entre os picos de retenção (Figura 12A).

As áreas dos picos obtidos por CLAE para o padrão de cumarina em diferentes concentrações (Tabela 3) foram utilizadas para a confecção da curva de calibração (Figura 11), a qual apresentou equação da reta: $y = 3.10^8x + 651441$, e coeficiente de determinação $R^2 = 0,9997$. O coeficiente de determinação indicou a qualidade do método utilizado e a equação da reta foi utilizada para o cálculo dos teores de cumarina no EE e ND. Sendo assim, as formulações apresentaram teores de cumarina de $2,658\text{mg.g}^{-1}$ e $0,004\text{mg.mL}^{-1}$ para EE e ND, respectivamente.

A formulação preparada a partir de nanodispersão apresentou menor concentração de cumarina quando comparada ao extrato etanólico, provavelmente, devido ao tamanho do espaço interno das partículas da nanodispersão.

As concentrações de cumarina presentes no extrato e nanodispersão foram utilizadas como base para a determinação das doses testadas nos ensaios biológicos com medula óssea de camundongos.

Tabela 3: Concentrações de cumarina e suas respectivas áreas sob a curva.

Cumarina (mg.mL ⁻¹)	n	Áreas sob a curva
0,50	3	133779500
0,25	3	66736330
0,125	3	32791940
0,0625	3	18876590
0,03125	3	8805572
0,015625	3	4502073

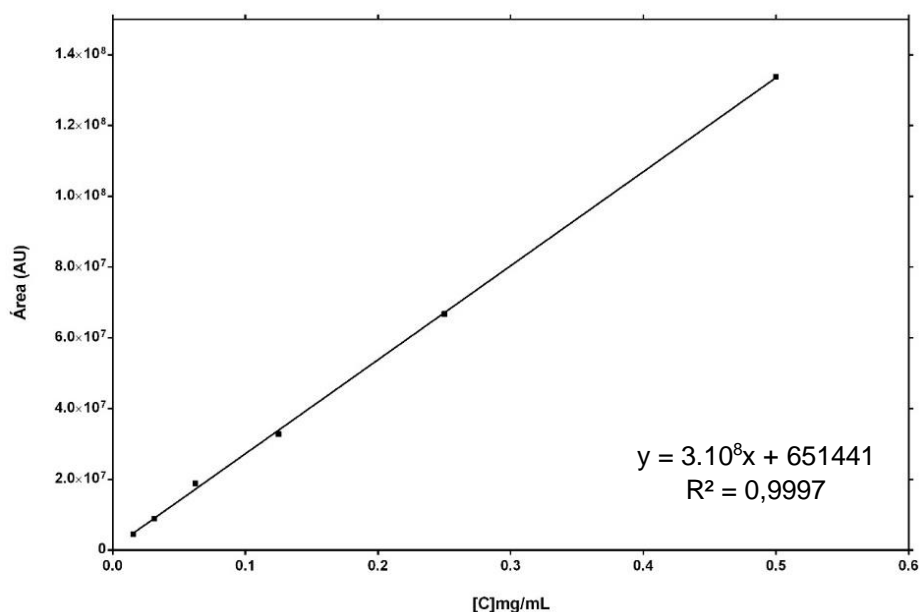


Figura 11: Representação da curva de calibração obtida por CLAE-UV/VIS para o padrão de cumarina. Fonte: Acervo pessoal.

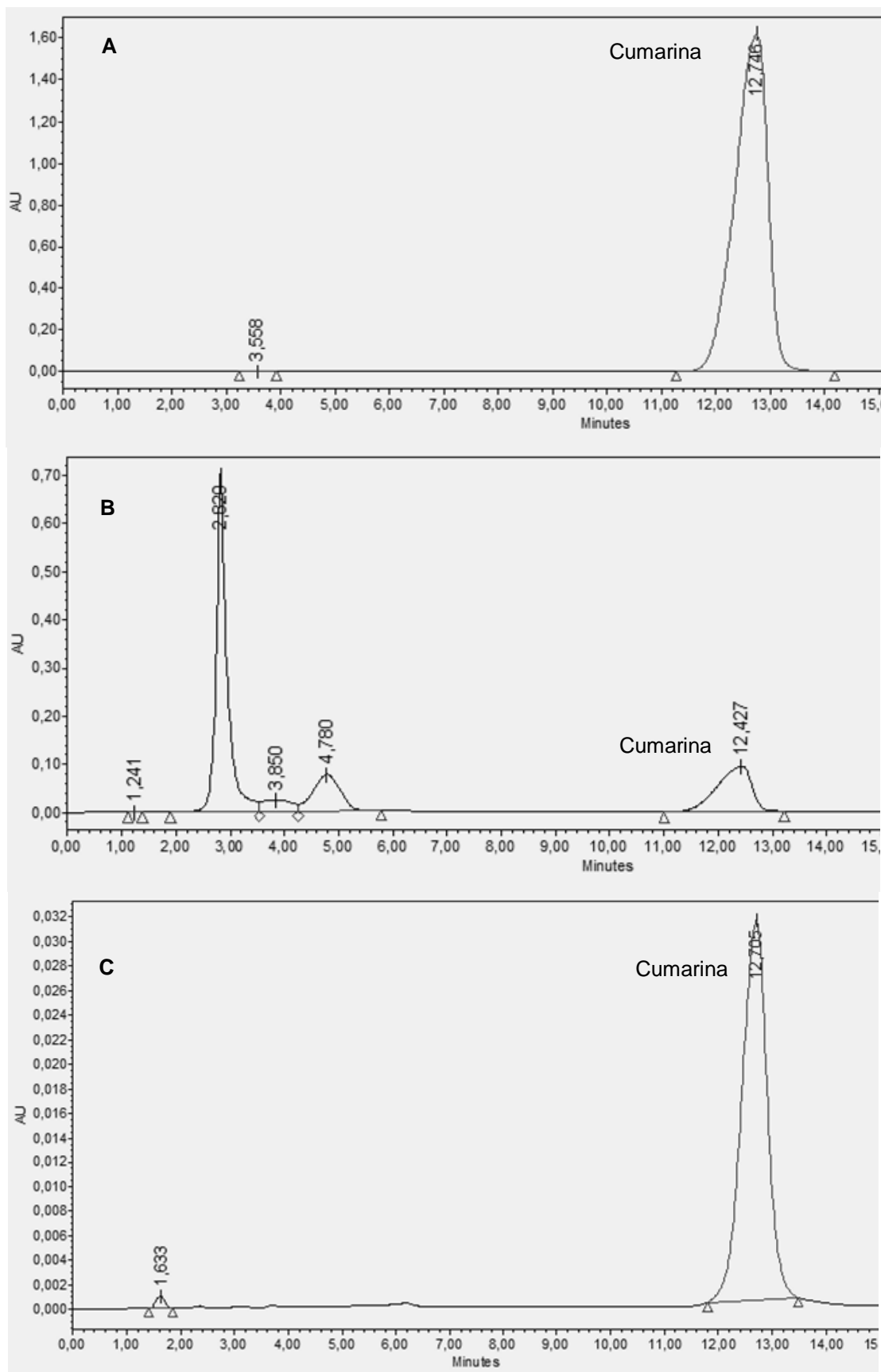


Figura 12: Cromatograma obtido por CLAE-UV/VIS da solução padrão de cumarina (A), extrato etanólico (EE) (B) e nanodispersão (ND) (C). Fonte: Acervo pessoal.

5.3 Ensaio do micronúcleo em medula óssea de camundongos

5.3.1 Avaliação da Citotoxicidade

Para avaliação da citotoxicidade, o parâmetro utilizado é a inibição do processo de eritropoiese que pode ser inferida pela redução da frequência de eritrócitos policromáticos (PCE) presentes na medula óssea (PATIL et al., 2013).

No presente estudo, os tratamentos simultâneos com o extrato etanólico e com a nanodispersão de *Mikania glomerata* determinaram, em quase todos os tratamentos, um aumento significativo da relação $PCE/(PCE+NCE)$ em comparação ao controle positivo (Tabela 4), o que indica uma ação positiva na prevenção de danos citotóxicos promovidos pela ciclofosfamida. Tal redução não foi observada no tratamento com extrato etanólico na concentração de $0,004\text{mg.kg}^{-1}$ de cumarina.

Quando a comparação dos resultados é feita dentro do mesmo grupo de formulação, observa-se que tanto os extratos, quanto as nanodispersões não diferiram entre si no comportamento de proteção contra os danos citotóxicos. Quando a comparação é realizada entre os grupos tratados com o extrato etanólico e com a nanodispersão, é possível verificar uma maior efetividade da nanodispersão em reduzir os danos citotóxicos promovidos pela ciclofosfamida.

Com destaque para o tratamento com nanodispersão na concentração de $0,008\text{mg.kg}^{-1}$ de cumarina que foi o tratamento mais efetivo, apresentando valores similares ao controle negativo, demonstrando que as nanodispersões possuem desempenho mais eficiente na ação quimioprotetora.

A ciclofosfamida promove citotoxicidade à célula principalmente devido à formação de ligações cruzadas no DNA e à fragmentação do material genético. Sendo assim, é possível que a efetividade da cumarina contra esta ação esteja relacionada à sua interação com a molécula de DNA, o que poderia interferir na ação da ciclofosfamida (SARWAR et al., 2015).

Tabela 4: Frequência de MNPCE e relação de PCE/(PCE+NCE), em 1000 células (média \pm DP), seguindo o protocolo de Tratamento Simultâneo com extrato etanólico e nanodispersão de *Mikania glomerata*.

	Tratamentos	MNPCE	PCE/(PCE+NCE)	Redução (%)
Controles	NaCl (0,9%)	7,417 \pm 3,58 ^d	0,628 \pm 0,04 ^a	-
	Ciclofosfamida (50mg.kg ⁻¹)	68,830 \pm 15,76 ^a	0,433 \pm 0,04 ^{fg}	-
	Controle Solvente	69,830 \pm 8,21 ^a	0,418 \pm 0,05 ^g	-
Extrato etanólico	1,00mg.kg ⁻¹	42,500 \pm 4,34 ^{bc}	0,505 \pm 0,02 ^{de}	42,87
	0,50mg.kg ⁻¹	41,250 \pm 10,18 ^{bc}	0,508 \pm 0,02 ^{cde}	44,91
	0,25mg.kg ⁻¹	38,830 \pm 7,98 ^{bc}	0,500 \pm 0,03 ^{de}	48,85
	0,008mg.kg ⁻¹	73,000 \pm 13,19 ^a	0,534 \pm 0,04 ^{cd}	-
	0,004mg.kg ⁻¹	67,920 \pm 15,01 ^a	0,477 \pm 0,06 ^{ef}	1,48
Nanodispersão	0,008mg.kg ⁻¹	31,750 \pm 11,33 ^c	0,605 \pm 0,06 ^{ab}	60,38
	0,004mg.kg ⁻¹	49,670 \pm 10,74 ^b	0,563 \pm 0,04 ^{bc}	31,20

As concentrações descritas nos tratamentos de extrato etanólico e nanoemulsão referem-se a mg.kg⁻¹ de cumarina. O Controle Solvente consistiu de nanodispersão sem a extração com *M. glomerata*. As letras iguais representam semelhança estatística entre os dados das colunas. (Teste estatístico: ANOVA/Tukey, $p < 0,05$)

No entanto, a ação da cumarina frente aos danos citotóxicos promovidos pela ciclofosfamida pode não ser tão acentuada devido a vários outros mecanismos de citotoxicidade da ciclofosfamida, como por exemplo, danos oxidativos e supressão da expressão de genes (MURATA et al., 2004; XIE et al., 2002).

5.3.2 Avaliação da Antimutagenicidade

A quimioprevenção é o processo pelo qual substâncias naturais ou sintéticas podem evitar, retardar ou reverter o câncer. Atualmente substâncias derivadas de plantas

têm gerado grande interesse na busca de novos agentes quimioprotetores. Um exemplo são as cumarinas. As cumarinas são moléculas comumente encontradas no reino vegetal que tem apresentado múltiplas atividades farmacológicas, incluindo o potencial de quimioprevenção. (BASKARAN et al., 2012; EMAMI; DADASHPOUR, 2015; KIM et al., 2014; NANTES et al., 2014).

Sendo assim, o presente trabalho propôs avaliar os efeitos do extrato etanólico e da nanodispersão de *Mikania glomerata*, sobre a mutagenicidade e citotoxicidade induzidas pelo agente antineoplásico ciclofosfamida, para isto, utilizou-se o teste do micronúcleo *in vivo* em células da medula óssea de roedores, este teste foi escolhido por ser muito importante na identificação de agentes mutagênicos/antimutagênicos, considerando vários fatores, tais como o metabolismo do organismo, a farmacocinética da substância e os mecanismos de reparo do DNA (BORIOLLO et al., 2014).

Na Tabela 4, estão expressos os resultados da avaliação do efeito antimutagênico no protocolo de tratamento simultâneo com o extrato etanólico e nanodispersão de *Mikania glomerata*.

Observou-se que os tratamentos com extrato etanólico nas concentrações 1,0; 0,5 e 0,25mg.kg⁻¹ de cumarina e com a nanodispersão nas concentrações de 0,008 e 0,004mg.kg⁻¹ de cumarina quando comparados ao CP, demonstraram uma redução significativa da frequência de micronúcleos, promovidos pela ação da ciclofosfamida, contudo tais danos não foram reduzidos aos níveis do controle negativo. Esses resultados também sinalizaram que o tratamento com a nanodispersão na concentração de 0,008mg.kg⁻¹ de cumarina apresentou maior efetividade, alcançando 60,38% de redução de danos mutagênicos.

Os tratamentos com extrato etanólico nas concentrações 0,008 e 0,004mg.kg⁻¹ de cumarina, quando comparados ao controle positivo, não apresentaram diferença significativa. Estes resultados sugerem que não houve redução da frequência de MNPCEs, e indicam que estas concentrações de cumarina presentes no extrato etanólico não foram capazes de proteger o organismo contra os danos causados pela ciclofosfamida, no protocolo de tratamento simultâneo.

A comparação dos resultados exibidos pelos tratamentos com extrato etanólico e nanodispersão nas concentrações de 0,008 e 0,004mg.kg⁻¹ de cumarina, em ambos,

ou seja, onde as concentrações de cumarina foram equivalentes para as duas formulações, demonstraram que os componentes ativos de *Mikania glomerata* administrados por meio das nanodispersões foram mais eficientes na ação quimioprotetora, pois apresentaram redução da frequência de micronúcleos, enquanto que as mesmas concentrações quando administradas sob a forma de extrato etanólico, não apresentaram efeito algum neste protocolo de tratamento.

A comparação feita entre a frequência de micronúcleos do grupo controle positivos (CP) e do grupo controle solvente (CS) demonstrou que esses grupos tiveram comportamentos semelhantes, demonstrando que os tensoativos utilizados na produção da nanodispersão não interferem nos danos causados pela ciclofosfamida, ou seja, o efeito observado para os grupos da nanodispersão é determinado pela ação protetiva das substâncias extraídas de *Mikania glomerata* presentes no interior das nanopartículas, dentre elas e de forma majoritária a cumarina.

Estudos anteriores demonstram que a cumarina, após a administração oral, é rapidamente absorvida através do trato gastrointestinal e distribuída pelo organismo (LACY; O'KENNEDY, 2004). Este fato ocorre porque a cumarina é uma substância apolar, o que torna fácil seu transporte pelas bicamadas lipídicas celulares através de difusão passiva e que combinado ao elevado coeficiente de partição favorece ainda mais a rápida absorção (GASPARETTO; PONTAROLO, 2010).

Porém, a cumarina sofre extenso efeito de primeira passagem onde é metabolizada no fígado através de citocromo P450 específico (CYP2A6), resultando em apenas 2-6% de moléculas intactas presentes na circulação sistêmica. As moléculas de cumarina presentes na circulação sistêmica ainda podem sofrer hidrólise, processo pelo qual são convertidas em ácido o-cumárico através da enzima paraoxonase (PON1) que está presente no sangue humano. Após metabolização, as moléculas resultantes, principalmente 7-hidroxycumarina e ácido o-cumárico são facilmente excretados. (GASPARETTO; PONTAROLO, 2010; LACY; O'KENNEDY, 2004).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que houve uma redução na frequência de micronúcleos nos tratamentos utilizando-se o extrato etanólico de *Mikania glomerata* nas concentrações de 1,0; 0,5 e 0,25mg.kg⁻¹ de cumarina, indicando a presença de atividade antimutagênica. Entretanto o mesmo efeito não foi observado nos tratamentos utilizando extrato com as concentrações de 0,008 e

0,004mg.kg⁻¹ de cumarina. Essa ausência de efeito contra os danos induzidos pela ciclofosfamida pode estar relacionada ao rápido metabolismo da cumarina no organismo, ao extenso efeito de primeira passagem sofrido no fígado e a rápida excreção dos metabólitos.

Os resultados obtidos com a nanoformulação, por sua vez, demonstraram que a nanodispersão apresentou um melhor desempenho quando comparado ao extrato etanólico, mesmo apresentando valores bem reduzidos do marcador químico. Esta melhor efetividade, principalmente com concentração de 0,008mg.kg⁻¹ de cumarina, na nanodispersão, pode ser explicada pelo fato de que esta formulação aumenta a biodisponibilidade da cumarina, permitindo assim que a substância permaneça presente na circulação sistêmica por maior período de tempo, evitando sua rápida metabolização, proporcionando assim, que o fármaco seja entregue com maior eficiência (HUSSEINI; PITT, 2008; TORCHILIN, 2001).

Estudos demonstram que sistemas de entrega de componentes lipofílicos baseados em nanopartículas evitam os efeitos de primeira passagem sofridos no fígado, pois após a ingestão, as partículas são desmontadas no trato gastrointestinal e em seguida reagrupadas no intestino delgado em nanopartículas contendo lipídios biológicos, conhecidas como micelas mistas (YAO; XIAO; MCCLEMENTS, 2014).

No enterócitos as micelas mistas são mais uma vez desmontadas e remontadas em outra forma de partícula, o quilomícrom. O quilomícrom transporta os componentes bioativos para a circulação sistêmica através do sistema linfático, evitando assim o metabolismo de primeira passagem. Ao acessar a circulação sistêmica os quilomícrons sofrem ação de lipases, liberando assim os componentes ativos (TREVASKIS; CHARMAN; PORTER, 2008; YAO; XIAO; MCCLEMENTS, 2014).

Desta forma, ao usarmos a nanodispersão, a molécula intacta de cumarina estaria mais disponível na circulação sistêmica e mais acessível à célula alvo para impedir os danos causados pela ciclofosfamida, o que não ocorre com a cumarina administrada fora do sistema nanoestruturado. Uma possibilidade é que a cumarina compita pelo mesmo local de ação da ciclofosfamida, pois Sarwar et al., (2015) demonstraram que a molécula de cumarina tem a capacidade de interagir de forma eletrostática com a molécula de DNA, se ligando ao sulco menor da fita, em regiões ricas em guanina-citosina (sítios G-C). Desta forma a presença da molécula de

cumarina nestes locais pode dificultar ou até mesmo impedir o processo de alquilação promovido pelos metabólitos da ciclofosfamida, resultando em menos danos causados às células.

Os resultados obtidos sugerem que a nanodispersão contendo substâncias extraídas de *Mikania glomerata* proporciona atividade antimutagênica superior ao extrato etanólico, mesmo contendo concentrações muito inferiores do marcador químico, reforçando a relevância da utilização da nanotecnologia para veiculação de compostos naturais e o potencial da tecnologia de extração de compostos através de nanodispersões.

No futuro, com aprimoramento do processo de obtenção das nanodispersões e aumento na concentração de cumarina nesta formulação, poderá ser possível a obtenção de resultados ainda mais promissores.

6 CONCLUSÕES

A extração de *Mikania glomerata* com dispersão aquosa de tensoativos não iônicos foi capaz de gerar nanodispersões, obtendo-se um fitoproduto nanobiotecnológico à base de uma importante droga vegetal.

Os tratamentos realizados com as duas formulações reduziram os danos citotóxicos promovidos pela ciclofosfamida, com exceção daquele feito com extrato etanólico na concentração de 0,004mg.kg⁻¹ de cumarina.

Os tratamentos com nanodispersão apresentaram maior efetividade em reduzir a citotoxicidade promovida pela ciclofosfamida. Com destaque para o tratamento com a nanodispersão na concentração de 0,008mg.kg⁻¹ de cumarina que apresentou valores similares ao controle negativo.

Os tratamentos com extrato etanólico nas concentrações 1,0; 0,5 e 0,25mg.kg⁻¹ de cumarina e com a nanodispersão nas concentrações de 0,008 e 0,004mg.kg⁻¹ de cumarina, demonstraram-se eficazes na redução da frequência de micronúcleos, apresentando-se como agentes antimutagênicos contra os danos induzidos pelo mutágeno, nessas condições experimentais.

Os tratamentos com extrato etanólico nas concentrações 0,008 e 0,004mg.kg⁻¹ de cumarina não determinaram redução da frequência de MNPCEs, indicando que esta formulação, nestas concentrações, não foi capaz de proteger o organismo contra os danos causados pela ciclofosfamida, neste protocolo de tratamento.

Os componentes ativos de *Mikania glomerata* administrados através das nanodispersões foram mais eficientes na ação quimioprotetora.

O efeito observado para a nanodispersão é proveniente das substâncias extraídas de *Mikania glomerata* presentes no interior das nanopartículas, pois os tensoativos utilizados na produção da nanodispersão não protegeram contra os danos causados pela ciclofosfamida.

7 REFERÊNCIAS

- ACOSTA, E. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, n. 1, p. 3–15, fev. 2009.
- ARALDI, R. P. et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74–82, maio 2015.
- ARAÚJO, C. R. F. et al. Perfil e prevalência de uso de plantas medicinais em uma unidade básica de saúde da família em Campina Grande, Paraíba, Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 2, p. 233–238, 2014.
- ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, dez. 2015.
- BALDISSERA, M. D. et al. Trypanocidal activity of the essential oils in their conventional and nanoemulsion forms: *in vitro* tests. **Experimental parasitology**, v. 134, n. 3, p. 356–61, jul. 2013.
- BASKARAN, N. et al. Chemopreventive Potential of Coumarin in 7 , 12-dimethylbenz [a] anthracene Induced Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, p. 5273–5279, 2012.
- BIELINSKA, A. U. et al. Distinct pathways of humoral and cellular immunity induced with the mucosal administration of a nanoemulsion adjuvant. **Journal of Immunology**, v. 192, n. 6, p. 2722–33, mar. 2014.
- BONIFÁCIO, B. V. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: A review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 1–15, dez. 2013.
- BORIOLO, F. M. G. et al. Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of *Ziziphus joazeiro* Mart . bark in the micronucleus assay. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 2, p. 428–438, jun. 2014.

BRASIL. ANVISA. RDC Nº 313, DE 25 DE OUTUBRO DE 2005. Aprova o Fascículo 6 da Parte II da 4 Edição da Farmacopéia Brasileira. **Diário Oficial da União**, nº 209, 31 de outubro de 2005, Seção 1, p. 1.

BRASIL. Decreto no 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, nº 119, 23 de junho de 2006, Seção 1, p. 2.

BRASIL. Instrução Normativa nº 2 de 13 de maio de 2014. Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado e Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado. **Diário oficial da União**, nº 90, 14 de maio de 2014, Seção 1, p.58.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1, de 2 de janeiro de 2015. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME 2014. **Diário oficial da União**, nº 2, 5 de janeiro de 2015, Seção 1, p.132.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, nº 84, 04 de maio de 2006, Seção 1, p. 20.

BUNKOVA, R.; MAROVA, I.; NEMEC, M. Antimutagenic Properties of Green Tea. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 60, n. 1, p. 25–29, jan. 2005.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 131–134, ago. 2005.

COSTA, I. C. et al. Development of Jojoba Oil (*Simmondsia chinensis* (Link) C.K. Schneid.) Based Nanoemulsions. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 33, n. 3, p. 459–463, jan. 2014.

COSTA, R. DE J. et al. *In vitro* study of mutagenic potential of *Bidens pilosa* Linné and *Mikania glomerata* Sprengel using the comet and micronucleus assays. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 1, p. 86–93, jun. 2008.

DALLA NORA, G. D. et al. Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikania glomerata* (Asteraceae). **Biocell**, v. 34, n. 3, p. 95–101, dez. 2010.

DASHWOOD, R. H. Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an “A-to-Z” guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models. **Mutation research**, v. 511, n. 2, p. 89–112, jan. 2002.

DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 402, n. 1-2, p. 151–158, jul. 1998.

DELARMELINA, J. M. **Avaliação da ação antimutagênica da ipriflavona contra os danos induzidos por ciclofosfamida**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Feral do Espírito Santo, Vitória - ES, 2012.

DOMINGOS, R. F. et al. Characterizing manufactured nanoparticles in the environment: Multimethod determination of particle sizes. **Environmental Science and Technology**, v. 43, p. 7277–7284, abr. 2009.

EMAMI, S.; DADASHPOUR, S. Current developments of coumarin-based anti-cancer agents in medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 102, p. 611–630, ago. 2015.

FAGUNDES, F.A., OLIVEIRA, L.B., VALADRES, M. *Annona Coriacea* Induz Efeito Genotóxico Em Camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 1, p. 24–29, jul. 2005.

FENECH, M. *In Vitro* Micronucleus Technique to Predict Chemosensitivity. **Methods in Molecular Medicine**, v. 111, p. 3–32, 2005.

FERGUSON, L. R. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. **Mutation research**, v. 307, n. 1, p. 395–410, jan. 1994.

FERLAY, J. et al. **GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base Nº 11**. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 14 ago. 2015, 17:10.

FERNANDES, C. P. **Desenvolvimento de uma nanoemulsão bioinseticida preparada com extrato de *Manilkara subsericea***. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Rio de Janeiro - Rio de Janeiro, 2014b.

FERNANDES, C. P. et al. Development of an insecticidal nanoemulsion with *Manilkara subsericea* (Sapotaceae) extract. **Journal of nanobiotechnology**, v. 12, n. 1, p. 22, jan. 2014a.

FORGIARINI, A. et al. Studies of the relation between phase behavior and emulsification methods with nanoemulsion formation. In: **Colloid & Polymer Science**. Progress in Colloid and Polymer Science. Heidelberg: Springer, 2000. v. 115p. 36–39.

GASPARETTO, J. C. et al. *Mikania glomerata* Spreng. e *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: estudos agronômicos, genéticos, morfoanatômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e uso nos programas de fitoterapia do Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 4, p. 627–640, set. 2010.

GASPARETTO, J. C.; PONTAROLO, R. Clinical and Toxicological Advances. **Toxicity and Drug Testing**, p. 297–321, 2010.

HAFNER, A. et al. Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1005–1023, fev. 2014.

HUSSEINI, G. A.; PITT, W. G. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 10, p. 1137–1152, jun. 2008.

IRACHE, J. M. et al. Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1-2, p. 47–71, maio 2011.

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **Biotech**, v. 5, n. 2, p. 123–127, abr. 2015.

KADA, T.; MORITA, K.; INOUE, T. Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. **Mutation Research**, v. 53, p. 351–353, dez. 1978.

KANG, S. H. et al. Recent advances in in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. **Journal of cancer prevention**, v. 18, n. 4, p. 277–88, dez. 2013.

KATSORI, A.M.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Coumarin derivatives: an updated patent review (2012-2014). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 24, n. 12, p. 1323–47, set. 2014.

KELMANN, R. G. et al. Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 342, n. 1-2, p. 231–239, maio 2007.

KIM, H. et al. Chemopreventive and Anticancer Activities of *Allium victorialis* var . *platyphyllum* Extracts. **Journal of cancer prevention**, v. 19, n. 3, p. 179–186, set. 2014.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation research**, v. 455, n. 1-2, p. 155–66, 20 nov. 2000.

LACY, A.; O'KENNEDY, R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. **Current pharmaceutical design**, v. 10, n. 30, p. 3797–3811, fev. 2004.

LIANG, R. et al. Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 30, p. 7548–55, 1 ago. 2012.

LOURENÇO, J. A. et al. Ausência de mutagenicidade e antimutagenicidade do extrato obtido das flores do ipê roxo [*Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex DC.) standl.]. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 4, p. 414–420, ago. 2010.

MARUNO, M. **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo - São Paulo, 2009.

MAZZORANA, D. M. et al. Influence of *Mikania laevigata* Extract over the Genotoxicity Induced by Alkylating Agents. **ISRN toxicology**, v. 2013, p. 521432, jan. 2013.

MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7, n. 6, p. 2297, nov. 2011.

MOURÃO, V. B. et al. Anti-hemorrhagic effect of hydro-alcoholic extract of the leaves of *Mikania glomerata* in lesions induced by *Bothrops jararaca* venom in rats. **Acta cirúrgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia**, v. 29, n. 1, p. 30–7, jan. 2014.

MURATA, M. et al. Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 6, p. 793–802, jun. 2004.

NAMASIVAYAM, N. Chemoprevention in experimental animals. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, n. 1, p. 60–71, jan. 2011.

NANTES, C. I. et al. Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of carrageenan fiber in cultured meristematic cells of *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 9523–9532, dez. 2014.

NAPIMOGA, M. H.; YATSUDA, R. Scientific evidence for *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata* as a pharmacological tool. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 62, n. 7, p. 809–820, mar. 2010.

PASQUALI, R. C.; TAUROZZI, M. P.; BREGNI, C. Some considerations about the hydrophilic-lipophilic balance system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 356, n. 1-2, p. 44–51, jan. 2008.

PATIL, S. L. et al. Antigenotoxic potential of rutin and quercetin in Swiss mice exposed to gamma radiation. **Biomedical journal**, v. 37, n. 5, p. 305–13, out. 2013.

PAUNESKU, T. et al. Biology of TiO₂-oligonucleotide nanocomposites. **Nature materials**, v. 2, n. 5, p. 343–6, maio 2003.

PITOT, H. C. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, v. 72, n. 3 Suppl, p. 962–970, mar. 1993.

PITOT, H. C.; DRAGAN, Y. P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 5, n. 9, p. 2280–2286, jun. 1991.

QIAN, C. et al. Nanoemulsion delivery systems: influence of carrier oil on β -carotene bioaccessibility. **Food chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1440–7, 1 dez. 2012.

RASKIN, I. et al. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 522–531, dez. 2002.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603–613, abr. 2001.

SARWAR, T. et al. Interaction of coumarin with calf thymus DNA: Deciphering the mode of binding by in vitro studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 73, p. 9–16, nov. 2015.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, fev. 2003.

SCHEIBE, P. O. Number of samples - hypothesis testing. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 35, n. 1, p. 3–9, out. 2008.

SERPELONI, J. M. et al. *In vivo* evaluation of anticlastogenicity of extracts from medicinal plants of *Miconia* genus using the micronucleus test. **Biologia**, v. 29, n. 1, p. 47–56, jun. 2000.

SILVA, C. R. et al. Método espectroscópico para determinação de cumarina em xarope de *Mikania glomerata* Sprengel. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 594–599, dez. 2008.

SILVA, D. G. E. **Desenvolvimento e avaliação in vitro de eficácia fotoprotetora de nanoemulsões contendo p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Medicamentos) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo - SP, 2013.

SILVA, L. S. et al. Preparation of dry extract of *Mikania glomerata* sprengel (Guaco) and determination of its coumarin levels by spectrophotometry and HPLC-UV. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 10344–10354, jan. 2012.

SILVA, R. **Pharmacopoeia dos Estados Unidos do Brasil**. São Paulo: Ed. Nacional, 1929.

SŁOCZYŃSKA, K. et al. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. **Journal of Applied Genetics**, v. 55, n. 2, p. 273–285, mar. 2014.

SUGUMAR, S. et al. Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. **Bulletin of entomological research**, v. 104, n. 3, p. 393–402, jun. 2014.

TORCHILIN, V. P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, n. 2-3, p. 137–172, mar. 2001.

TREVASKIS, N. L.; CHARMAN, W. N.; PORTER, C. J. H. Lipid-based delivery systems and intestinal lymphatic drug transport: A mechanistic update. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 6, p. 702–716, 2008.

TURRINI, E.; FERRUZZI, L.; FIMOGNARI, C. Potential Effects of Pomegranate Polyphenols in Cancer Prevention and Therapy. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2015, p. 938475, jul. 2015.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, fev. 2005.

VIEIRA, L. C. C. **Síntese de uma coleção de cumarinas, possíveis inibidores da enzima acetilcolinesterase**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2010.

WANG, L. et al. Design and optimization of a new self-nanoemulsifying drug delivery system. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 330, n. 2, p. 443–448, nov. 2009.

XIE, H.J. et al. Effect of cyclophosphamide on gene expression of cytochromes P 450 and h-actin in the HL-60 cell line. **European Journal of Pharmacology**, v. 449, n. 3, p. 197–205, 2002.

YAO, M.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J. Delivery of Lipophilic Bioactives: Assembly, Disassembly, and Reassembly of Lipid Nanoparticles. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 5, p. 53–81, 2014.

ZHANG, Y. et al. The preparation of 3,5-dihydroxy-4-isopropylstilbene nanoemulsion and *in vitro* release. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 649–657, mar. 2011.

**ANEXO A - Aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da
Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA/UFES)**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do potencial antimutagênico de nanoemulsão e de extrato bruto de Mikania glomerata Sprengel, por meio de teste de micronúcleo em roedores..", protocolo nº. 18/2015, sob a responsabilidade de Maria do Carmo Pimentel Batitucci que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO(A) Centro de Ciências da Saúde-Maruípe-Vitória-ES em reunião de 07/08/2015.

Vigência do Projeto	Início: Agosto/2015	Término: Abril/2016
Espécie/Linhagem	Camundongos Swiss	
Nº de Animais	Experimento Piloto: 20	Protocolo Experimental: 96 Total: 116
Peso/Idade	Peso: não especificou Idade: Adulto	
Sexo	Macho	
Origem	Mamíferos	
	Vitória (ES), 07 de agosto 2015.	

Presidente do
 Comitê de Ética no Uso de Animais
 CEUA/UFES